

Aus dem Zentrum für Klinische Tiermedizin  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Arbeit angefertigt unter der Leitung von Prof. Dr. W. Hermanns

# **Immunhistochemische Untersuchung des oralen amelanotischen malignen Melanoms des Hundes**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von Manuela Hipp  
aus Benediktbeuern

München 2012

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Braun  
Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Hermanns  
Korreferent/en: Prof. Dr. Fischer

Tag der Promotion: 21. Juli 2012

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>Seite</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2. LITERATURÜBERSICHT</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Das Pigment Melanin</b>	<b>3</b>
2.1.1 Arten von Melanin	3
2.1.1.1 Eumelanin und Pheomelanin	3
2.1.1.2 Neuromelanin	4
2.1.1.3 Melanin im Fettgewebe	4
2.1.2 Melanogenese	4
2.1.3 Weitergabe von Melanosomen an Keratinozyten	10
2.1.4 Funktion des Melanins	13
<b>2.2 Der Melanozyt</b>	<b>15</b>
2.2.1 Die lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Morphologie des epidermalen Melanozyten	15
2.2.2 Lokalisationen und Funktion der Melanozyten im Körper	21
2.2.3 Embryogenese	31
<b>2.3 Melanozytäre Neoplasien des Menschen</b>	<b>33</b>
2.3.1 Übersicht der Einteilung der kutanen benignen melanozy- tären Neoplasien des Menschen	33
2.3.1.1 Die erste Gruppe: gewöhnliche melanozytäre Nävi und Sonderformen	34
2.3.1.2 Die zweite Gruppe: atypischer/dysplastischer melanozytärer Nävus	39

2.3.1.3	Die dritte Gruppe: kongenitaler Nävus	41
2.3.2	Klassische Einteilung der kutanen malignen Melanome des Menschen	42
2.3.2.1	Superfiziell spreitendes Melanom (SSM)	42
2.3.2.2	Lentigo maligna Melanoma (LMM)	43
2.3.2.3	Noduläres malignes Melanom (NMM)	43
2.3.2.4	Akral lentiginöses Melanom (ALM)	44
2.3.3	Extrakutane Melanome des Menschen	45
2.3.4	Beurteilung der Malignität	46
2.3.5	Zellvarianten	47
<b>2.4</b>	<b>Melanozytäre Neoplasien des Hundes</b>	<b>49</b>
2.4.1	Allgemeines	49
2.4.2	Orale Melanome des Hundes	51
2.4.3	Klassifizierung der melanozytären Neoplasien des Hundes	52
2.4.3.1	Benigne melanozytäre Tumore	52
2.4.3.1.1	Lentigo	52
2.4.3.1.2	Melanozytom	53
2.4.3.2	Maligne Melanome des Hundes	55
2.4.3.2.1	Epitheloide Melanome	56
2.4.3.2.2	Spindelzellige Melanome	56
2.4.3.2.3	Gemischter Typ	56
2.4.3.2.4	Dendritische Form	57
2.4.3.2.5	Ballonzellen Melanom	57
2.4.3.2.6	Siegelringzellenmelanom	57
2.4.3.2.7	Adenomatöse/papilläre Zellen	58
2.4.3.2.8	Knorpelartige und/oder osteoide Formation	58

<b>2.5</b>	<b>Differentialdiagnosen für das maligne Melanoms des Hundes</b>	<b>58</b>
<b>2.6</b>	<b>Diagnosemöglichkeiten</b>	<b>60</b>
2.6.1	Enzymnachweise	60
2.6.2	Nachweis von Glykogen	60
2.6.3	Histochemische Nachweismethoden für Melanin oder andere Pigmente	61
2.6.3.1	Fontana-Masson-Färbung	61
2.6.3.2	Schmorls Technik zum Nachweis für reduzierende Substanzen	61
2.6.4	Immunzytochemie	61
2.6.5	Nachweis von genetischen Abnormalitäten	62
2.6.5.1	Comparative genomic hybridization (CGH)	62
2.6.5.2	Fluorescence in situ hybridization (FISH)	63
2.6.6	Elektronenmikroskopie	64
2.6.7	Immunhistochemie	65
2.6.7.1	Grundprinzip	65
2.6.7.1.1	Antigene	65
2.6.7.1.2	Antikörper	66
2.6.7.1.3	Antikörper-Antigen Bindung	67
2.6.7.2	Detektionssysteme	68
2.6.7.2.1	Direktes Detektionssystem	68
2.6.7.2.2	Indirektes Detektionssystem	69
2.6.7.2.3	Mehrschrittverfahren	69
2.6.7.2.3.1	Lösliche Enzym- Immunkomplex Methoden	69
2.6.7.2.3.2	Avidin-Biotin Methoden	71

2.6.7.3	Indikatormoleküle und Chromogene	72
2.6.7.4	Gegenfärbung	73
2.6.7.5	Probleme der Immunhistochemie	73
2.6.7.5.1	Hintergrundfärbung	73
2.6.7.5.2	Kreuzreaktionen	74
2.6.7.5.3	Endogene Peroxidaseaktivität	74
2.6.8	Immunhistochemie am menschlichen Melanom	75
2.6.8.1	Erste Hauptgruppe: melanozytäre Differenzierungsmarker	75
2.6.8.1.1	S100-Proteinfamilie	75
2.6.8.1.2	HMB45	77
2.6.8.1.3	MelanA/MART-1	79
2.6.8.1.4	Anti-Tyrosinase	80
2.6.8.1.5	MITF	81
2.6.8.1.6	NKI/C3	82
2.6.8.1.7	MEL-1/Klon R24	82
2.6.8.1.8	PNL2	83
2.6.8.2	Zweite Hauptgruppe: Melanom Progressionsmarker	84
2.6.9	Immunhistochemie beim kaninen Melanom	86
2.6.9.1	MelanA	88
2.6.9.2	S100	89
2.6.9.3	HMB45	90
<b>3.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>93</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchungsmaterial</b>	<b>93</b>
3.1.1	Untersuchungsmaterial für die Immunhistochemie	93

3.1.1.1	Melanome mit einem amelanotischen Teil- bereich vom Hund	93
3.1.1.2	Andere differentialdiagnostisch relevante Tumore	96
3.1.1.3	Tumore mit der Differentialdiagnose „amelanotisches Melanom“ vom Hund	98
3.1.1.4	Normales Gewebe vom Hund, das getestet wurde, um Kreuzreaktionen auszuschließen	100
3.1.1.5	Positivkontrollen	100
3.1.2	Untersuchungsmaterial für die Elektronenmikroskopie	101
<b>3.2</b>	<b>Fixation</b>	<b>102</b>
3.2.1	Fixation für die Paraffineinbettung	102
3.2.2	Fixation für die Epoxidharzeinbettung	102
<b>3.3</b>	<b>Einbettung</b>	<b>103</b>
3.3.1	Paraffineinbettung	103
3.3.2	Epoxidharzeinbettung	104
<b>3.4</b>	<b>Anfertigen der Gewebeschnitte</b>	<b>105</b>
3.4.1	Herstellung der Paraffinschnitte	105
3.4.2	Herstellung der Paraffinschnitte für die Immunhistochemie	106
3.4.3	Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten für die Elektronenmikroskopie	106
<b>3.5</b>	<b>Übersichtsfärbungen</b>	<b>108</b>
3.5.1	Hämatoxylin / Eosin (H.E.)-Färbung am Paraffinschnitt	108

3.5.2	Giemsa-Färbung am Paraffinschnitt	109
-------	-----------------------------------	-----

<b>3.6</b>	<b>Immunhistochemie</b>	<b>110</b>
------------	-------------------------	------------

3.6.1	Allgemeines	110
-------	-------------	-----

3.6.1.1	Unterdrückung der unspezifischen Hintergrundreaktionen	110
---------	--	-----

3.6.1.2	Hemmung der endogenen Peroxidase	111
---------	----------------------------------	-----

3.6.1.3	Demaskierung des Antigens	111
---------	---------------------------	-----

3.6.2	Immunhistochemie mit HMB45	111
-------	----------------------------	-----

3.6.2.1	Verwendete Antikörper, Pufferlösungen, Färbungen und Chromogene	111
---------	---	-----

3.6.2.2	Beschreibung der immunhistochemischen Protokolle für HMB45	112
---------	--	-----

3.6.3	Immunhistochemie mit MelanA	122
-------	-----------------------------	-----

3.6.3.1	Verwendete Antikörper, Pufferlösungen, Färbungen und Chromogene	122
---------	---	-----

3.6.3.2	Beschreibung des immunhistochemischen Protokolls für MelanA	122
---------	---	-----

3.6.4	Immunhistochemie mit S100	125
-------	---------------------------	-----

3.6.4.1	Verwendete Antikörper, Pufferlösungen, Färbungen und Chromogene	125
---------	---	-----

3.6.4.2	Beschreibung der immunhistochemischen Protokolle für S100	126
---------	---	-----

3.6.5	Kontrollen	128
-------	------------	-----

3.6.5.1	Negativkontrollen	128
---------	-------------------	-----

3.6.5.2	Positivkontrollen	129
---------	-------------------	-----



3.6.6	Verwendete Pufferlösungen	129
3.6.7	Chromogene	130
3.6.8	Färbungen	131
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>133</b>
<b>4.1</b>	<b>Immunhistochemie HMB45</b>	<b>136</b>
4.1.1	Negativkontrollen mit HMB45	142
<b>4.2</b>	<b>Immunhistochemie mit MelanA</b>	<b>143</b>
4.2.1	Negativkontrollen mit MelanA	156
<b>4.3</b>	<b>Immunhistochemie mit S100</b>	<b>156</b>
4.3.1	Negativkontrollen mit S100	157
<b>4.4</b>	<b>Abschließende Beurteilung der Immunhistochemie</b>	<b>158</b>
<b>4.5</b>	<b>Elektronenmikroskopie</b>	<b>158</b>
4.5.1	Beurteilung der Melanome mit einem amelanotischen Teilbereich	158
4.5.1.1	Präparat E 579/09	158
4.5.1.2	Präparat E 1739/09	158
4.5.2	Beurteilung der rundzelligen Neoplasie E 2137/09	160

<b>5.    DISKUSSION</b>	<b>161</b>
<b>5.1   Immunhistochemie</b>	<b>161</b>
5.1.1   HMB45 158	161
5.1.2   MelanA	167
5.1.3   S100	169
<b>5.2   Elektronenmikroskopische Untersuchung</b>	<b>170</b>
<b>6.    ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>173</b>
<b>7.    SUMMARY</b>	<b>175</b>
<b>8.    LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>177</b>
<b>9.    HERSTELLERVERZEICHNIS</b>	<b>205</b>
<b>9.1   Chemikalien und sonstige Materialien</b>	<b>205</b>
<b>9.2   Geräte</b>	<b>207</b>
<b>10.   ANHANG</b>	<b>209</b>

## 1. EINLEITUNG

Melanome zählen zu den am häufigsten diagnostizierten Neoplasien in der Maulhöhle des Hundes (SMITH et al. 2002, GOLDSCHMIDT 1994). Melanome der Maulschleimhaut wachsen meist schnell, invasiv und metastasieren zu regionalen Lymphknoten und entfernten Organen. Außerdem ist die Rezidivrate nach einer chirurgischen Entfernung sehr hoch (BERGMAN 2007, SMITH et al. 2002, RAMOS-VARA et al. 2000). Nur eine korrekte Diagnose lässt Aussagen über den weiteren Krankheitsverlauf, die Prognose und über eine sinnvolle Behandlungsstrategie zu (SMEDLEY et al. 2011, SULAIMON et al. 2002). Eine korrekte Diagnose ist deshalb entscheidend für den Patienten und damit auch für den Besitzer. Eine histologische Diagnose von pigmentierten Melanomen ist meist relativ unproblematisch. Probleme treten dann auf, wenn Melanome nicht pigmentiert sind. Die außergewöhnlich hohe morphologische Zellvielfalt kann in der histologischen Diagnostik gegebenenfalls zu Verwechslungen mit anderen Tumorarten führen. Es ist deshalb notwendig, weitere diagnostische Mittel zu verwenden, um eine korrekte Diagnose stellen zu können.

Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe der Elektronenmikroskopie und der Immunhistochemie amelanotische Melanome in der Maulhöhle des Hundes sicher zu diagnostizieren. Mittels der Elektronenmikroskopie sollten die, für Melanozyten typischen, Melanosomen nachgewiesen werden. Ziel der Immunhistochemie war es, mit Hilfe der Antikörper HMB45, MelanA und S100 typische melanozytäre Antigene in der Tumorzelle zu identifizieren, um den melanozytären Ursprung der Tumorzelle nachweisen zu können.



## **2. LITERATURÜBERSICHT**

### **2.1 Das Pigment Melanin**

#### 2.1.1 Arten von Melanin

##### 2.1.1.1 Eumelanin und Pheomelanin

Vögel und Säugetiere produzieren zwei Haupttypen von Melanin: Das schwarz-braune Eumelanin und das gelblich-rötliche Pheomelanin. Beide Arten werden in Melanozyten und im Pigmentepithel der Retina produziert (ITO 2009). Die Charakterisierung von Melanin ist schwierig. Andere Biopolymere wie z.B. Proteine, Polysaccharide oder Nukleinsäuren bestehen aus monomeren Einheiten, die durch kovalente Bindungen miteinander verbunden sind. Diese können relativ einfach durch Enzyme oder chemische Methoden in ihre einzelnen Komponenten gespalten werden. Im Gegensatz dazu, bestehen Melaninpigmente aus vielen verschiedenen Einheiten, die durch starke Kohlenstoffbrücken (C-C) miteinander verbunden sind. Trotzdem weiß man mittlerweile, dass Eumelanin aus 5,6-Dihydroxyindol (DHI)-Einheiten und 5,6-Dihydroxyindol-2-Karboxylsäure (DHICA)-Einheiten, die im oxidierten oder reduzierten Zustand vorliegen können, besteht. Pheomelanin besteht hauptsächlich aus Benzothiazin-Einheiten und zu einem gewissen Grad aus Benzothiazolen (SLOMINSKI et al. 2004, ITO 2003). Die meisten natürlich vorkommenden Melaninpigmente sind vom gemischten Typ und beinhalten sowohl Eumelanin als auch Pheomelanin (ITO 2009). Auch die Melaninpigmente in der Haut und im Haar lassen sich dem Eumelanin und/oder dem Pheomelanin zuordnen (LE PAPE et al. 2008, SULAIMON und KITCHELL 2003).

#### 2.1.1.2 Neuromelanin

Ein Pigment ähnlich dem Melanin in der Haut kann in den katecholaminergen Neuronen der Substantia nigra und in den Neuronen des Locus coeruleus gefunden werden. Man bezeichnet dieses Pigment als Neuromelanin (BUSH et al. 2006, ZECCA et al. 2004). Es besteht aus einem Pheomelanin-Kern, der von Eumelanin umgeben ist und einigen, bis jetzt unidentifizierten Peptiden und aliphatischen Komponenten. Aufgrund der Struktur ist Neuromelanin in der Lage, stabile Komplexe mit Metallen wie z.B. Eisen, Quecksilber und Zink zu bilden (ZECCA et al. 2008, ZECCA et al. 2004).

In weiteren Studien wurden Pigmente auch im Putamen, Premotor cortex und im Cerebellum gefunden. Untersuchungen dieses kürzlich entdeckten Pigments ergaben einen ähnlichen Aufbau wie der des Neuromelanins. Allerdings unterscheiden sich die Ausgangssubstanzen der Pigmente. Man geht davon aus, dass dieses Pigment dieselbe Funktion wie Neuromelanin hat (ZECCA et al. 2008).

#### 2.1.1.3 Melanin im Fettgewebe

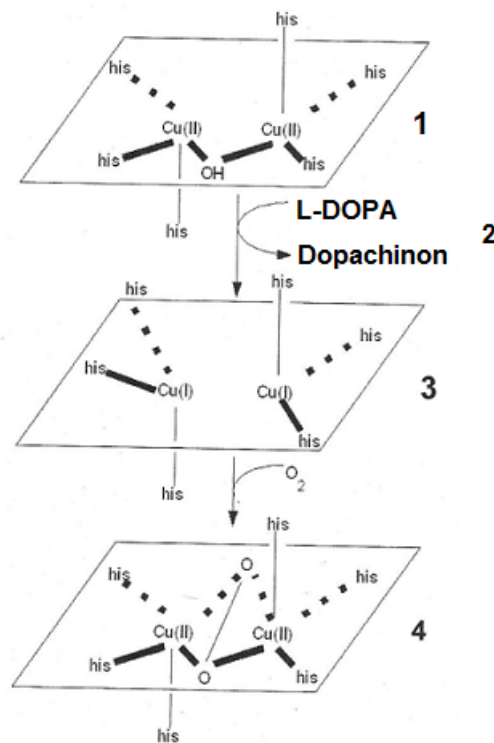
Kürzlich wurde Melanin im menschlichen Fettgewebe entdeckt. Es wird vermutet, dass das Vorhandensein von Melanin in Adipozyten eine Art Anti-Entzündungsfaktor darstellt, und dass damit der oxidative Schaden der Fettzellen reduziert wird (RANDHAWA et al. 2009).

#### 2.1.2 Melanogenese

Das charakteristische Merkmal eines Melanozyten sind seine Melanosomen, welche im Zytoplasma lokalisiert sind (SEIJI et al. 1961). In diesen spezialisierten Organellen wird das Melaninpigment produziert. Melanosomen sind große Organellen mit einem Durchmesser von ungefähr 500 nm (WASMEIER et al.

2008). Sie sind nahe Verwandte der Lysosomen (WASMEIER et al. 2008, ANCANS et al. 2001, DELL'ANGELICA et al. 2000, ORLOW 1995).

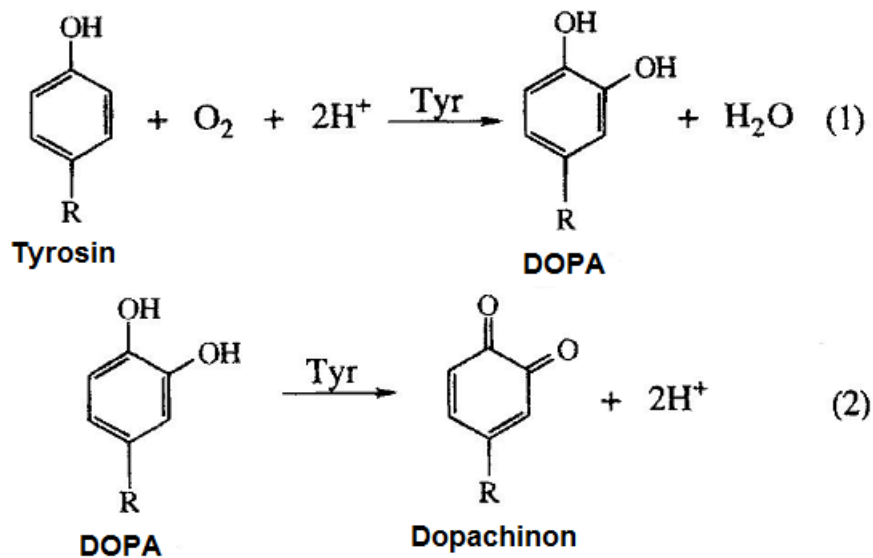
Melanosomale Proteine können in drei Kategorien eingeteilt werden, nämlich in enzymatische Komponenten, strukturelle Komponenten und Proteine mit noch unbekannter Funktion (HEARING 2005). Zur enzymatischen Komponente zählt u.a. die Tyrosinase (HEARING 2005). In der inaktiven Form (met-deoxy-Tyrosinase) liegen die zwei Kupferionen im aktiven Zentrum des Enzyms in der Kupfer(II)-Oxidationsstufe vor. Beide Kupferzentren sind an jeweils drei Histidinreste gebunden. Die inaktive Form ist nicht in der Lage, molekularen Sauerstoff zu binden (TOLLESON 2005, SOLOMON et al. 1996). Durch die Oxidation von L-DOPA zu Dopaquinon werden Elektronen frei, die met-deoxy-Tyrosinase zu deoxy-Tyrosinase reduzieren. Die Kupferionen im aktiven Zentrum des Enzyms liegen nun in der Oxidationsstufe I vor. Deoxy-Tyrosinase ist in der Lage, molekularen Sauerstoff zu binden. Nach dieser Bindung liegt das Enzym jetzt in der aktiven Oxy-Tyrosinase Form vor (s. Abb. 1) (TOLLESON 2005, VAN GASTEL et al. 2000, SOLOMON et al. 1996).



**Abb. 1:** Katalytischer Zyklus der zwei Kupferzentren in der aktiven Seite der menschlichen Tyrosinase. (1) Inaktive met-deoxy-Tyrosinase (2) Freiwerden von Elektronen (3) Reduktion zur deoxy-Tyrosinase, diese Form kann Sauerstoff binden (4) Aktive Oxy-Tyrosinase, die Tyrosin bindet und zu Dopachinon umwandelt (TOLLESON 2005).

Die Oxy-Tyrosinase, als aktive Enzymform, ist fähig, L-Tyrosin zu binden und katalysiert die Orthohydroxylierung von Tyrosin zu DOPA (s. Abb. 2 (1)) und die Oxidation von DOPA zu Dopachinon (s. Abb. 2(2)) (SOLOMON et al. 1996).





**Abb. 2:** Umwandlung von L-Tyrosin zu Dopachinon durch die aktive Oxy-Tyrosinase (TYR) (SOLOMON et al. 1996).

(1) Orthohydroxylierung von Tyrosin zu DOPA

(2) Oxidation von DOPA zu Dopachinon

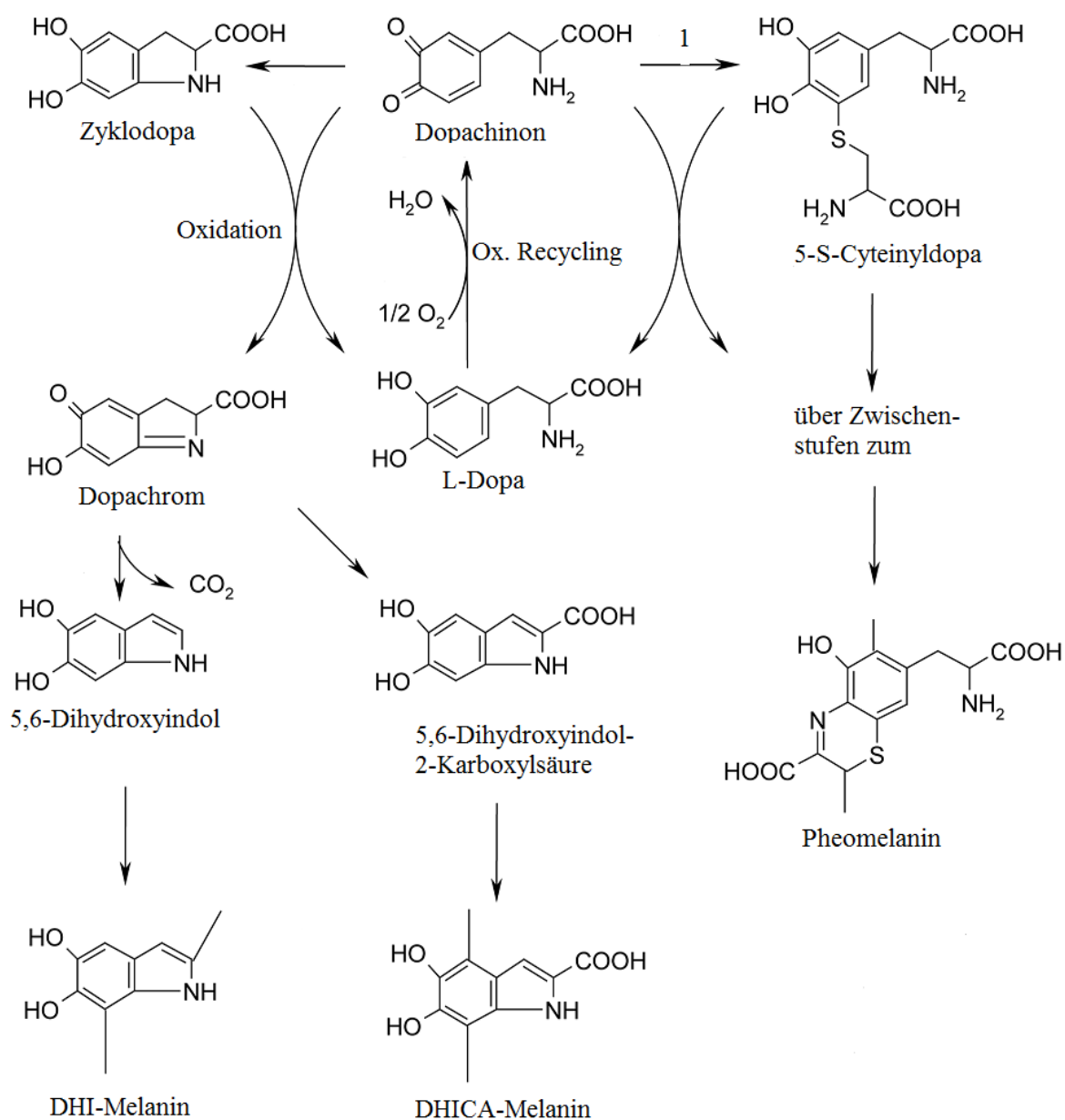
Dopaquinon stehen drei unterschiedliche chemische Wege zur Verfügung, abhängig von den Aktivitäten von Tyrosinase, Tyrosinase related protein 1 und Dopachrom Tautomerase, dem Gehalt von L-Tyrosin und L-Cystein im Melanosom und dem pH-Wert (ANCANS et al. 2001) im Melanosom (TOLLESON 2005).

Bei übermäßigem Gehalt von L-Cystein im Melanosom (Cysteinkonzentration von  $> 10^{-7}$  M) entsteht aus Dopachinon 5-S-Cysteinyl-dopa und in geringeren Mengen 2-S-Cysteinyl-dopa. Durch Oxidation bilden sich Benzothiazine, die sich durch Polymerisation zu Pheomelanin zusammenschließen. Tyrosin und

Cystein werden durch ein melanosomales Transportsystem für die Melanogenese zur Verfügung gestellt (s. Abb. 3).

Wenn keine Thiole zur Verfügung stehen, bildet Dopachinon durch Zyklisierung Leukodopachrom (= Zyclodopa), welches leicht, ohne enzymatische Unterstützung, oxidiert durch einen Überfluss an Dopaquinonen. Es entsteht Dopachrom und L-DOPA. Tyrosinase katalysiert das oxidative Recycling von L-DOPA zu Dopaquinon. Dopachrom tautomerisiert spontan zu 5,6-Dihydroxyindol-2-Karboxylsäure (DHICA). Bei der Präsenz der Dopachrom-Tautomerase, wird Dopachrom schneller, unter Auslassung der Dekarboxylierung, zu DHICA umgewandelt. Polymerisation von DHICA-Molekülen führt zum DHICA-Melanin (s. Abb. 3).

Dopachrom kann allerdings auch dekarboxylieren. Es entsteht 5,6-Dihydroxyindol (DHI). Durch Polymerisation von DHI-Molekülen entsteht DHI-Melanin (s. Abb. 3) (TOLLESON 2005, ITO 2003).



**Abb. 3:** Vereinfachte Darstellung der Synthese von DHI- und DHICA-Melanin und Pheomelanin ausgehend von Dopachinon nach TOLLESON. (1) Zufügen von L-Cystein (TOLLESON 2005).

DHICA-Melanin ist schwarz-braun, hat ein niedrigeres Molekulargewicht als DHI-Melanin und ist etwas besser wasserlöslich als DHI-Melanin. DHI-Melanin ist schwarz und nicht wasserlöslich (TOLLESON 2005).

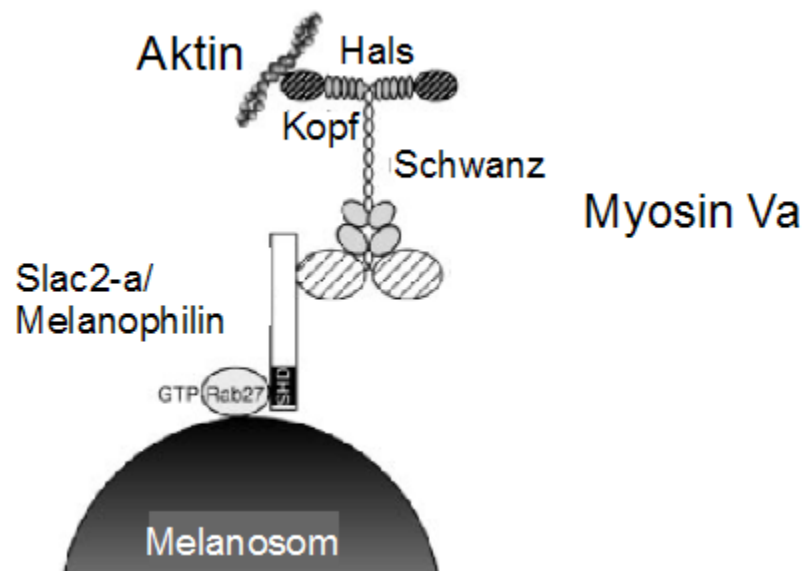
### 2.1.3 Weitergabe von Melanosomen an Keratinozyten

Die Melanozyten der Haut transferieren ihre Melanosomen zu den benachbarten Keratinozyten. Melanozyten im Haarbulbus geben das Melanin an kortikale und medulläre Keratinozyten weiter. Man geht davon aus, dass für die Übertragung von Melanosomen in Haut und Haar derselbe Mechanismus verantwortlich ist (VAN DEN BOSSCHE et al. 2006). Bei den Melanozyten im Auge dagegen verbleiben die Melanosomen intrazellulär (WASMEIER et al. 2008).

#### *Transport der Melanosomen innerhalb des Melanozyten*

Reife Melanosomen befinden sich in der Nähe des Zellkerns (WASMEIER et al. 2008). Um den späteren Transfer von Melanosomen zu den Keratinozyten zu ermöglichen, müssen die zellkernnahen Melanosomen in die Fortsätze des Melanozyten transportiert werden (SINGH et al. 2008, HEARING 2005). Zwei verschiedene Mechanismen sind zum einen für den zentrifugalen Transport der Melanosomen in die Dendritenenden und zum anderen für deren periphere Akkumulation im Dendritenende verantwortlich (WU et al. 1998). Mikrotubuli sind Teil des Zytoskelettes und die Motorproteine Kinesin und Dynein sind in der Lage, sich an die Mikrotubuli zu binden. Unter ATP-Verbrauch wandern die Motorproteine am Mikrotubulus entlang und ziehen die Melanosomen mit sich (WU und HAMMER 2000). Der Transport mit Hilfe der Mikrotubuli bewegt die Melanosomen vom Zellzentrum in die Peripherie aber auch von der Peripherie wieder zurück ins Zellzentrum. Somit würde es zu keiner Akkumulation der Melanosomen im Dendritenende kommen. Aktinfilamente kommen selten im zentralen Zytoplasma vor, dafür ist die Zellperipherie sehr aktinreich (WU et

al. 1998). Das Melanosom verfügt über ein GTP-Bindungsprotein RAP27A, welches Slac2-a/Melanophilin bindet. Slac2-a/Melanophilin bindet wiederum Myosin Va, welches sich an Aktin heftet (s. Abb. 4) (FUKUDA et al. 2002).



**Abb. 4:** Graphische Darstellung der Bindung eines Melanosoms über verschiedene Proteine an Aktin (FUKUDA et al. 2002).

Die Bindung des Melanosoms an letztendlich Aktin in der aktinreichen Zellperipherie führt zu einer Akkumulation von Melanosomen in den Dendriten, was einen Transport von Melanosomen zum Keratinozyten erst ermöglicht (SINGH et al. 2008).

Der Melanozyt und die ihn umgebenden 30 bis 40 epidermalen Keratinozyten, die von ihm mit Melanin versorgt werden, werden als „epidermale Melanin Einheit“ bezeichnet (TOLLESON 2005, TSATMALI et al. 2002).

### *Transport der Melanosomen zum Keratinozyten*

Vier mögliche Theorien werden diskutiert (VAN DEN BOSSCHE et al. 2006):

#### *1. Exozytose*

Die regulierte Exozytose ist ein Prozess, in welchem die Membranen zytoplasmatischer Organellen mit der Plasmamembran fusionieren. Dieser Prozess erfolgt als eine Antwort auf bestimmte Stimuli. In diesem Fall fusioniert die melanosomale Membran mit der Plasmamembran des Melanozyten. Das extrazelluläre Melanin wird von den benachbarten Keratinozyten durch Phagozytose aufgenommen. Für diese Theorie sprechen elektronenmikroskopische Untersuchungen, die „nacktes Melanin“ im intrazellulären Raum von menschlicher Haut und Haarfollikeln gefunden haben. Außerdem wurden Pseudopodien von Keratinozyten beobachtet, die dieses Melanin einhüllen (YAMAMOTO und BHAWAN 1994, SWIFT 1964). Auch dass Melanin nicht von einer Membran umgeben ist, wenn es sich im extrazellulären Raum befindet, unterstützt diese Hypothese. Es ist bekannt, dass Melanozyten bestimmte Moleküle (SNAREs, RabGTPase) exprimieren, die für ihre regulierende Rolle in der Exozytose bekannt sind (SCOTT und ZHAO 2001).

#### *2. Zytophagozytose*

Zytophagozytose bedeutet, dass eine lebende Zelle oder ein intakter Teil einer lebenden Zelle phagozytiert wird. Hier wird vom Keratinozyten die Spitze des melanozytären Dendriten phagozytiert. Zuerst berührt der Melanozyt mit seinem Fortsatz einen Keratinozyten. Der Keratinozyt reagiert mit einer Ausstülpung seiner Membran. Durch zytoplasmatische Äste wird der Dendrit vom Melanozyten abgetrennt und vom Keratinozyten aufgenommen. Anschließend formt sich ein Phagolysosom. Die Membran des Melanozyten und die zytoplasmatischen Bestandteile werden dort abgebaut. Das Phagolysosom zerfällt in einzelne Melaningranula oder Melaninaggregate (OKAZAKI et al. 1976). Diese Theorie stützt

sich ebenfalls auf elektronenmikroskopische Untersuchungen (YAMAMOTO und BHAWAN 1994).

### *3. Fusion von Plasmamembranen*

Die melanozytäre Plasmamembran fusioniert mit der Plasmamembran des Keratinozyten. Das Ergebnis ist eine Pore oder ein Kanal, welcher das Zytoplasma beider Zellen enthält und durch den der Transport der Melanosomen vonstatten geht. Filopodien sollen sich von den Fortsätzen und dem Zellkörper des Melanozyten ausgehend ausbreiten. Sie können sich an die Oberfläche der benachbarten Keratinozyten anheften, dort fusionieren und anschließend den Transport von Melanosomen ermöglichen. Ein definitiver Beweis dieser Theorie konnte noch nicht erbracht werden, obwohl auf elektronenmikroskopischen Bildern dünne Projektionen gesehen werden können, die zwischen Melanozyten und Keratinozyten verlaufen (RUSTOM et al. 2004, SCOTT et al. 2002).

### *4. Transfer durch Membranvesikel*

Diese Hypothese wird als nicht sehr wahrscheinlich angesehen, obwohl elektronenmikroskopisch solche Membranvesikel gesehen wurden. Der Melanozyt schnürt melanosomhaltige Vesikel ab, die entweder vom Keratinozyten phagozytiert werden oder mit der Plasmamembran des Keratinozyten fusionieren (ASPENGREN et al. 2006, CERDAN et al. 1992).

## 2.1.4 Funktion des Melanins

Melaninpigmente sind einer der entscheidenden Faktoren der phänotypischen Erscheinung (SULAIMON und KITCHELL 2003). Die Variationen in Haut- bzw. Fellfarbe beruhen zum einen auf einem unterschiedlichen Melaningehalt und auf verschiedenen Melanintypen. Eumelanin erscheint braun bis schwarz, währenddessen Pheomelanin rötlich ist. Zum anderen bewirkt der Tyndall-Effekt

eine bläuliche Farbe, wenn Pigmente in der Tiefe lokalisiert sind (MOOI und KRAUSZ 2007 S.1 und 10).

Sowohl Eumelanin als auch Pheomelanin sind in der Lage freie Radikale einzufangen. Man nimmt an, dass diese Fähigkeit der Grund dafür ist, dass Melanin als Antioxidans reagieren kann, und auch die photoprotektive Rolle in der Haut und im Auge beruht auf dieser Eigenschaft (ROZANOWSKA et al. 1999). Melanin existiert als ein stabiles freies Radikal. Es kann sowohl Oxidationen als auch Reduktionen durchlaufen (SULAIMON und KITCHELL 2003). Melanin ist ein Polymer. Aufgebaut ist es aus einzelnen Monomeren, die sich zu flachen Melanin Protomolekülen anordnen. Diese wiederum lagern sich zu Filamenten zusammen, die sich letztendlich zu Melanin Partikeln zusammenlagern. Allerdings sind dieser Prozess und die Regelung der Zusammenlagerung der Komponenten noch nicht völlig verstanden. Das Polymer hat eine Reihe von funktionellen Gruppen, die in der Lage sind, ultraviolette Photonen oder reaktive oxygene Spezies (ROS) zu binden. Beispiele hierfür sind einzelne Sauerstoffmoleküle, Hydroxylradikale und Superoxidanionen, die entstehen, wenn Photonen aus ultravioletter Strahlung mit Membranlipiden oder anderen zellulären Chromophoren reagieren (TOLLESON 2005, SULAIMON und KITCHELL 2003, ROZANOWSKA et al. 1999). Diese Eigenschaft hängt vom Redoxpotential und der Ladung des Radikals ab. Auch spielt für die Bindung von Radikalen die Anzahl der zur Verfügung stehenden Gruppen im Melanin eine Rolle, die wiederum vom pH-Wert abhängen. Das Radikal muss außerdem in der Nähe der Pigmentgranula entstehen, um gebunden werden zu können. Trotz dieser Voraussetzungen wird davon ausgegangen, dass Melanin die Pigmentzellen vor Schäden aufgrund freier Radikale schützt (ROZANOWSKA et al. 1999).

Innerhalb der Keratinozyten bildet das Melanin eine supranukleäre Kappe. Diese schützt den Kern vor Schäden durch UV-Photonen. Eine Studie hat gezeigt,



dass die Melaninkappe die Anzahl von potentiellen karzinogenen DNA-Photoprodukten senkt, verglichen mit der Anzahl in epidermalen Zellen ohne Melaninkappe (KOBAYASHI et al. 1998).

## **2.2 Der Melanozyt**

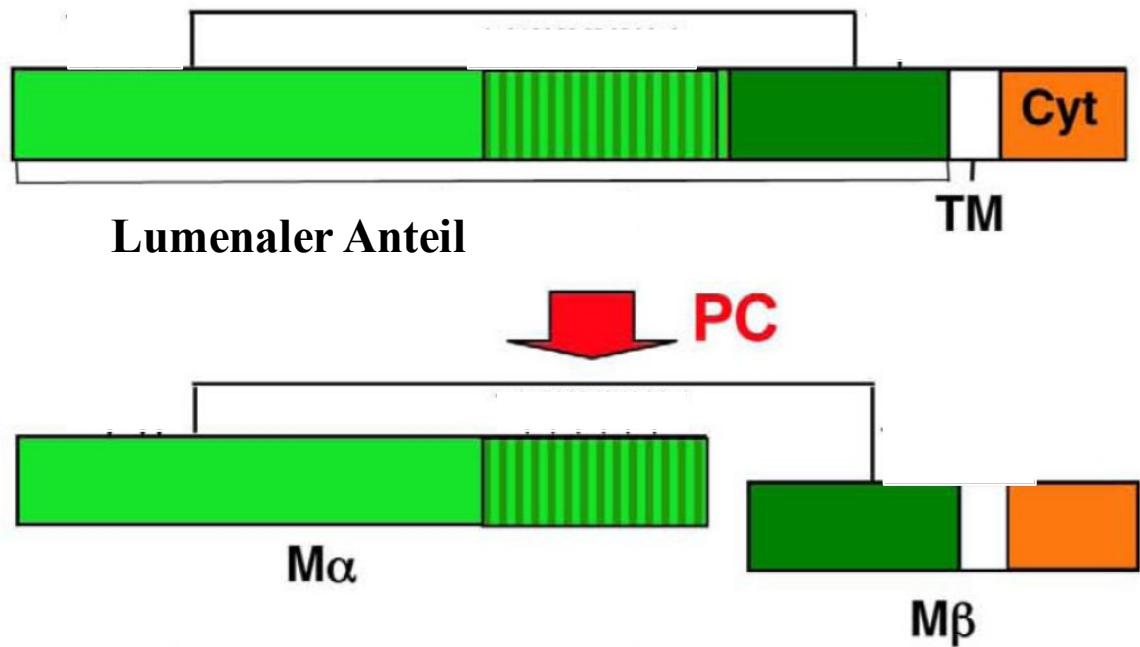
### **2.2.1 Die lichtmikroskopische und elektronenmikroskopische Morphologie des epidermalen Melanozyten**

Im H.E.-Schnitt liegt der Melanozyt auf der epidermalen Basalmembran, die er manchmal leicht nach unten hin auswölbt. Es sind kleine Zellen mit einem dunklen und runden Nukleus, der oval, oder, aufgrund der Fixation, unregelmäßig geformt ist. Er ist vertikal, horizontal oder schräg orientiert. Der Nukleus eines Melanozyten ist kleiner als der, der ihn umgebenden Keratinozyten. Der epidermale Melanozyt weist nur wenig und helles Zytoplasma auf, welches aufgrund der Fixation oft schrumpft. Die Fortsätze, die sich zwischen den Keratinozyten erstrecken und kein Pigment enthalten, sind in einem H.E.-Schnitt nicht zu sehen. Melanin erscheint im Zytoplasma des Melanozyten häufig fein granulär. Wenn die Melaninsynthese sehr aktiv ist, dann erscheint das Zytoplasma grau. Häufig ist es jedoch so, dass kein Melanin im Melanozyten zu sehen ist (MOOI und KRAUSZ 2007 S. 6-8). Das Melanin im Keratinozyten dagegen ist immer granulär und erscheint grobkörnig.

Durch die Elektronenmikroskopie lässt sich die typische Organelle des Melanozyten, das Melanosom, nachweisen (GHADIALLY F. N. 1985 S. 106). Es können Eumelanosomen und Pheomelanosomen unterschieden werden (RAPOSO et al. 2001). Melanosomen reifen innerhalb des Melanozyten oder innerhalb des Pigmentepithels der Retina, wobei sie vier unterschiedliche morphologische Stadien durchlaufen (RAPOSO und MARKS 2007). Die Ontogenese des Eumelanosoms ist noch nicht völlig verstanden. Der Ursprung der Melanosomen wurde kontrovers diskutiert.

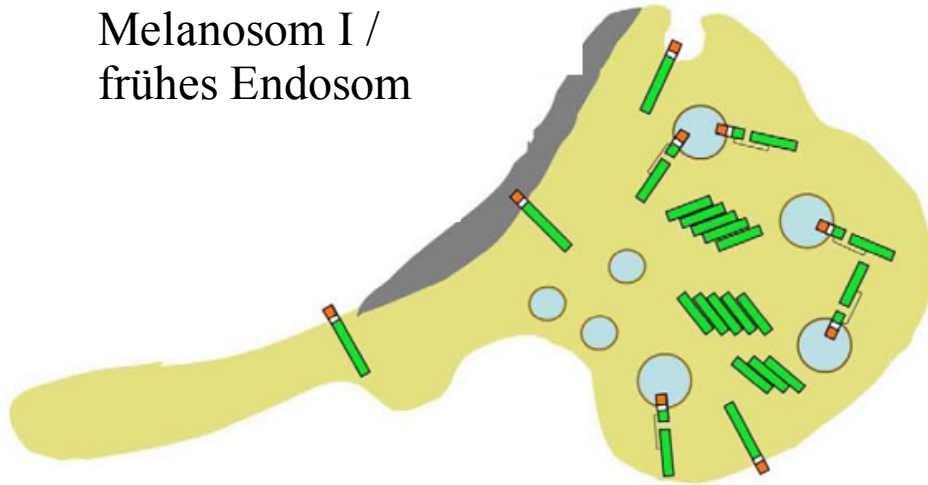
Mittlerweile wird die Meinung vertreten, dass sich Melanosomen aus dem Endozytoseweg entwickeln. Innerhalb des Endozytoseweges existiert ein Sortierungsprozess, der die Biogenese von melanosomalen Kompartimenten im Melanozyten erlaubt und ein einzigartiger Mechanismus, um die Kompartiment-Identität der Melanosomen beizubehalten (RAPOSO et al. 2001).

Enzymatische (z.B. Tyrosinase) und strukturelle Komponenten werden vom Melanozyten produziert und müssen zum richtigen Zeitpunkt zum sich entwickelnden Melanosom transportiert werden (RAPOSO und MARKS 2007). Ein Beispiel hierfür ist PMEL17 (ME 20, gp100, RPE1, Silver locus protein). PMEL17 ist aufgrund seiner Primärstruktur ein Typ 1 Integralmembran-Protein (DELL'ANGELICA 2003). Es ist verantwortlich für die Streifung und für die Form der Melanosomen (RAPOSO und MARKS 2007). Entlang der, für die Streifung verantwortlichen Fibrillen, lagern sich Melaninpigmente ab, währenddessen sich die Enzyme im Lumen des Melanosoms befinden (DELL'ANGELICA 2003). PMEL17 wird vom Melanozyten produziert und muss zum Melanosom I transportiert werden. Der komplette Transportweg von PMEL17 ist noch nicht bekannt. Ein Teil scheint durch die Plasmamembran des Melanosoms I zu diffundieren, während der andere Teil durch Endosomen zum Melanosom I transportiert wird. Im Melanosom I findet eine Akkumulation von PMEL17 in der Membran des Melanosom I und in den Membranen der intralumenalen Vesikeln statt. Durch eine Proprotein Konvertase wird PMEL17 in zwei Teile gespalten, nämlich in M $\alpha$  und M $\beta$  (s. Abb. 5). M $\alpha$  dissoziiert von den Membranen und formt Fibrillen innerhalb des Melanosoms I (s. Abb. 6), welche sich im Melanosom II vollständig organisieren (s. Abb. 7). Nach der Formierung der Streifung, werden die Enzyme zum Melanosom transportiert (RAPOSO und MARKS 2007).



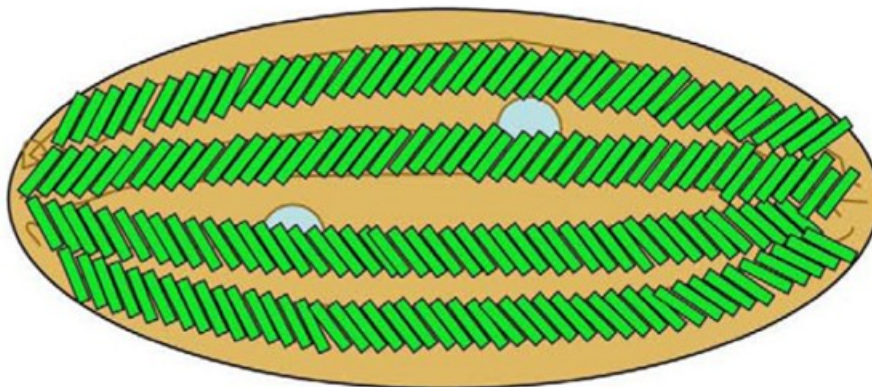
**Abb. 5:** Schematische Darstellung der Primärstruktur von PMEL17, mit dem lumenalen, dem transmembranen (TM) und dem zytoplasmatischen Anteil (Cyt), sowie die Spaltung durch die Proprotein Konvertase (PC) (RAPOSO und MARKS 2007).

### Melanosom I / frühes Endosom



**Abb. 6:** Darstellung eines Melanosoms I, mit Hülle (grau), intralumenalen Vesikeln (hellblau) und PMEL17.  $M\alpha$  beginnt von den Membranen zu dissoziieren und formt kleine unregelmäßige Fibrillen (RAPOSO und MARKS 2007).

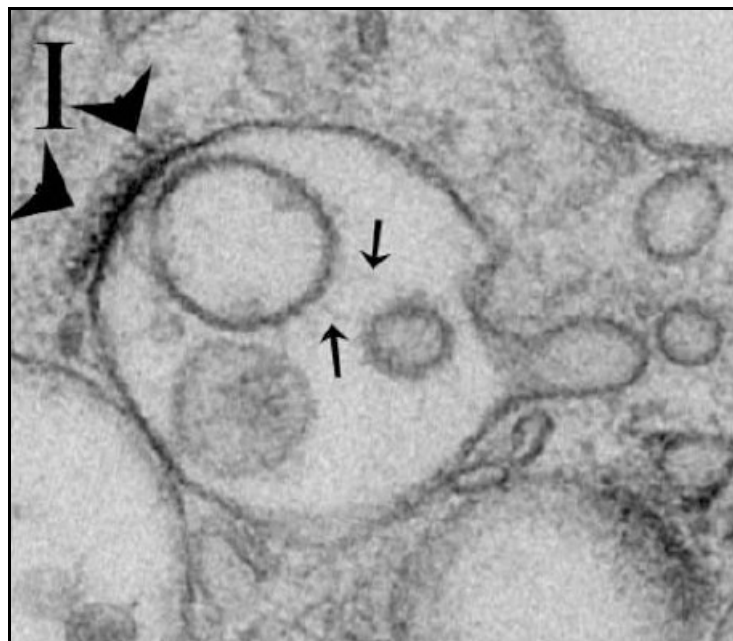
### Melanosom II



**Abb. 7:** Darstellung der Fibrillenformierung im Melanosom II,  $M\alpha$  Fragmente organisieren sich im Melanosom (RAPOSO und MARKS 2007).

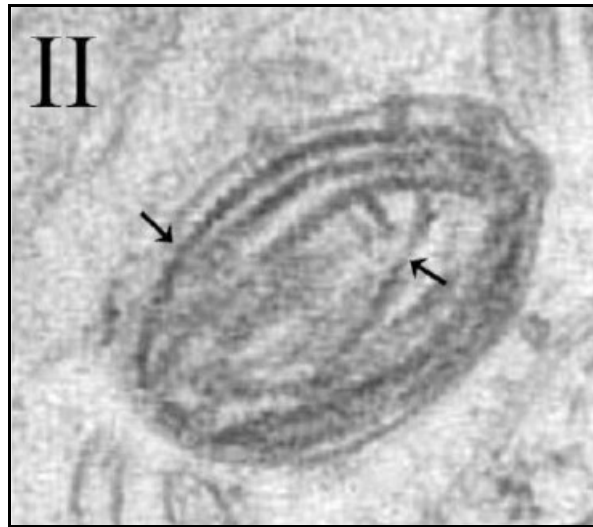
Frühe elektronenmikroskopische Studien führten zu der Einteilung der Melanosomen in vier Reifestadien (DELL'ANGELICA et al. 2000).

Das Melanosom I (s. Abb. 8) gleicht strukturell einem behüllten Vesikel. Diese Hülle besteht aus Clathrin, einem Protein (RAPOSO und MARKS 2007), welches bei der Ontogenese den Sortierungsprozess zwischen lysosomalen und melanosomalen Komponenten möglicherweise ermöglicht (RAPOSO et al. 2001). Elektronenmikroskopisch stellt sich das Melanosom I rund mit intralumenalen Vesikeln dar (RAPOSO und MARKS 2007). Die Größe der Organelle beträgt ca. 0,3  $\mu\text{m}$ .



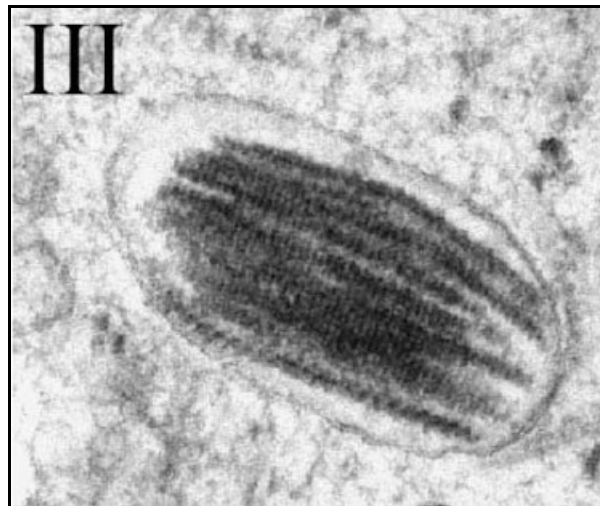
**Abb. 8:** Melanosom I, Pfeilköpfe deuten auf die Hülle, die Pfeile auf die intralumenalen Vesikel (RAPOSO und MARKS 2007).

Im Melanosom II (s. Abb. 9) wird das typische Streifenmuster dieser Organelle sichtbar. Die Form wird ovaler (RAPOSO und MARKS 2007).



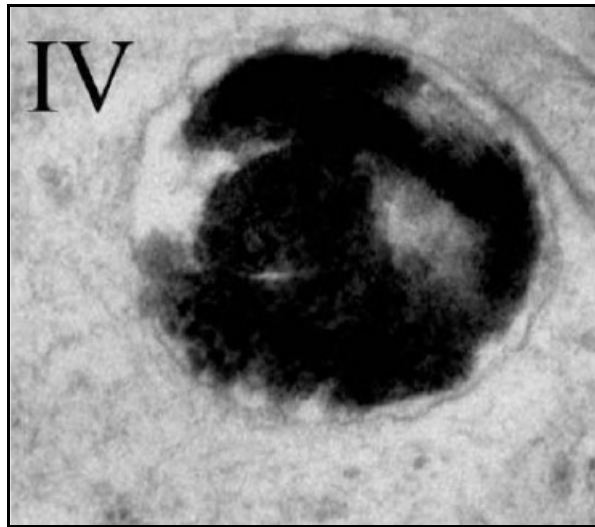
**Abb. 9:** Melanosom II, Pfeile deuten auf die Streifung (RAPOSO und MARKS 2007).

Melanosom III (s. Abb. 10) enthält deutliche Melaninablagerung entlang der Fibrillen.



**Abb. 10:** Melanosom III, mit deutlich sichtbaren Melaninablagerungen entlang der Fibrillen ( RAPOSO und MARKS 2007).

Im Melanosom IV (s. Abb. 11) ist nur noch das elektronendichte Melanin zu erkennen. Die Streifung ist nicht mehr zu sehen.



**Abb. 11:** Melanosom IV (RAPOSO und MARKS 2007).

Außerdem besitzt der Melanozyt als Zeichen einer metabolisch aktiven exokrinen Zelle einen prominenten Golgi-Komplex. Der Melanozyt weist im Gegensatz zur epithelialen Zelle keine Tonofilamente und Desmosomen auf. Das Zytoplasma des Melanozyten ist weniger elektronendicht als das des Keratinozyten (GHADIALLY 1985 S.107).

Die Entwicklung eines Pheomelanosoms ist weniger genau erforscht, als die Ontogenese eines Eumelanosoms (RAPOSO und MARKS 2007, SLOMINSKI et al. 2004). Die Organellen sind in jedem Stadium rundlich und die Pheomelaninablagerung beginnt schon im zweiten Stadium (SLOMINSKI et al. 2004).

### 2.2.2 Lokalisationen und Funktionen der Melanozyten im Körper

Melanozyten sind an verschiedenen Stellen im Körper lokalisiert. Die Hauptlokalisation ist die Haut. Dort findet man sie in der Epidermis und in den Haarfollikeln. Der Melanozyt wird auch als eine territoriale Zelle bezeichnet (MOOI und KRAUSZ 2007 S.7), da er in seiner Hauptlokalisation der Haut, immer von

mehreren Keratinozyten umgeben ist und somit keinen Kontakt zum benachbarten Melanozyten hat (SMITH et al. 2002).

Weitere Lokalisationen von Melanozyten sind: Cochlea, Auge, Gehirn und Herz.

### *Cochlea*

Die Stria vascularis bildet die laterale Wand der Scala media. Die Stria vascularis besteht aus drei Zelllagen: Marginalzellen, Zwischenzellen und Basalzellen. Die Zwischenzellen stellen Melanozyten dar. Die Scala media ist mit Endolymph gefüllt. Die besonderen Kennzeichen dieser Flüssigkeit sind der hohe Kalium- und niedrige Natriumgehalt. Diese Ionenkonzentrationen führen zu einer positiven Spannung von ca. 80 mV (TACHIBANA 1999). Im Zwei-Zellen-Modell tragen die Marginalzellen nur einen sehr kleinen Teil zum positiven Potential bei. Die positive Ladung wird hauptsächlich durch die Zwischenzellen erzeugt (WANGENMANN et al. 1995). Diese Zellen besitzen ins Zellinnere gerichtete  $K^+$  Kanäle und spannungsabhängige, auswärts gerichtete  $K^+$  Kanäle, welche das positive endokochleare Potential aufrechterhalten und somit das Hören erst ermöglichen (TAKEDA et al. 2007).

Außerdem spielt die Differenzierung der Zwischenzellen eine wichtige Rolle in der Embryogenese der Cochlea, ohne die eine korrekte Entwicklung nicht möglich wäre (TAKEDA et al. 2007, TACHIBANA 1999).

Zwischenzellen sind ebenfalls in der Lage Melanin zu produzieren. Wenn die Cochlea Lärm ausgesetzt ist, dann ist die Folge, dass reaktive Sauerstoffspezies auftreten. Melanin kann diese binden. Es wird angenommen, dass die geringere Lärmempfindlichkeit der pigmentierten Cochlea auf diesem Phänomen beruht (TACHIBANA 1999). Außerdem bindet Melanin viele Chemikalien, u.a. ototoxische Substanzen wie z.B. Aminoglykoside (TAKEDA et al. 2007, TACHIBANA 1999).



*Auge, Pigmentepithel der Retina (RPE)*

Im Auge findet man Melanozyten im Pigmentepithel der Retina (retinal pigment epithel = RPE) und in der Uvea. Das RPE ist eine einlagige Zellschicht, die aus kubischen Zellen besteht, deren apikale Seite mit Mikrovilli besetzt ist, die Kontakt zu den äußeren Segmenten der Photorezeptorzellen herstellen. Die seitlichen Wände der Zellen formen Tight, Adhaerens und Gap Junctions und die basale Seite hat Kontakt mit der Bruch Membran, welche das RPE von der Chorioidea trennt. Eine Besonderheit des PRE ist, dass diese Pigmentzellen nicht wie die übrigen von der Neuralleiste abstammen, sondern sie entwickeln sich direkt aus dem optischen Neuroepithel. Das PRE hat eine bedeutende Funktion in der Embryogenese des Auges, indem es u.a. die Gestaltung des Ziliärkörpers und der Iris mitsteuert, die retinale Neurogenese beeinflusst und die Vaskularisation der Chorioidea reguliert. Bei adulten Säugetieren bilden das PRE und die Retina eine funktionelle Einheit. Es unterstützt die Photorezeptoren bei der Ernährung. Das PRE formt die Blut/Retina Barriere, kontrolliert den Ionenfluß und hält den oxidativen Schaden in Grenzen und außerdem sorgt es für die Auffüllung von 11-cis Retinal nach der Umwandlung zu 11-trans Retinal. Zusätzlich zu der unterschiedlichen Abstammung weisen kutane Melanozyten und RPE noch weitere Unterschiede auf. Während kutane Melanozyten individuelle Zellen sind, die im ständig wechselnden Gewebe leben, haben Zellen des RPE andere Zellen des RPE, also somit andere Melanozyten, als Nachbarn. Die Umgebung verändert sich nicht (BHARTI et al. 2006).

*Auge, Uvea*

Melanozyten finden sich in der Uvea, die aus der Chorioidea, dem Ziliärkörper und der Iris besteht. Die Chorioidea liegt im hinteren Teil des Auges und ist von der Retina durch die Bruch-Membran abgegrenzt. Die Chorioidea geht im

vorderen Teil des Auges in den Ziliarkörper und die Iris über. Chorioidea und Ziliarkörper sind an der Sklera befestigt, während die Iris frei in die Augenkammer hineinreicht und dadurch die Pupille formt. Die Pigmentation der Iris schützt die darunterliegenden Kapillaren, Muskeln und motorischen Nerven, die den Lichteinfall durch die Pupille regulieren. Die uvealen Melanozyten weisen ebenfalls Unterschiede zu den kutanen Melanozyten auf. Die Uvea ist sehr viel besser durchblutet als die Epidermis, so dass Melanozyten im Auge u.a. einen leichteren Zugang zu Blut gebundenen Faktoren haben. Zusätzlich haben Melanozyten im Auge Kontakt zu den Fibroblasten, die die Sklera bilden, zu den vaskulären Endothelzellen, die die Choriokapillaren formen, und außerdem haben sie Kontakt zu anderen Melanozyten. Ein letzter Unterschied ist, dass die uvealen Melanozyten ihre produzierten Melanosomen nicht an andere Zellen abgeben (TOLLESON 2005).

### *Herz*

Es wurden auch Melanozyten an den Mitral-, Trikuspidal- und den Aortenklappen und an den Ventrikular- und Atrialsepten im Herzen von Mäusen gefunden. Es scheint so, als ob sich der Grad der Pigmentation der Haut, in der Pigmentation des Herzens widerspiegelt (YAJIMA und LARUE 2008). Die Melanozyten im Herzen scheinen von denselben Vorläuferzellen abzustammen wie die Melanozyten der Haut (BRITO und KOS 2008). Die Funktion der Melanozyten im Herzen ist noch unbekannt (PLONKA et al. 2009).

### *Gehirn*

Melanozyten sind auch innerhalb der ventrolateralen Leptomeningen lokalisiert, die die Pons und die Medulla oblongata bedecken (GOLDGEIER et al. 1984). Die genaue Funktion dieser Melanozyten ist noch nicht bekannt. Aber die Neigung der Melanozyten, sich um die Blutgefäße zu versammeln (FETISSOV

et al. 1999, MORSE und KOVA 1984), lässt darauf schließen, dass sie eine Schutzrolle haben. Wahrscheinlich fangen sie toxisches Material aus der Zirkulation ab (TOLLESON 2005).

### *Epidermis*

Bei den meisten Säugetieren ist die Hauptlokalisation der Melanozyten in den Haarfollikeln. Nur bei den Säugetierspezies, die wenig behaart sind, wie z.B. dem Menschen, findet sich die größere Anzahl der Melanozyten in der Epidermis (TOLLESON 2005). Auf die photoprotektive Rolle des Melanins und die Bedeutung der Pigmente für die phänotypische Erscheinung wurde schon eingegangen. Melanozyten sind polydendritische Zellen mit einem zentralen Nukleus und einem Zellkörper von unterschiedlicher Größe (STARICCO und PINKUS 1957). Das Perikaryon ist der Ursprung einer unterschiedlichen Anzahl von Fortsätzen (BILLINGHAM und SILVERS 1960). Während früher angenommen wurde, dass die Dendriten der Melanozyten in einer bestimmten Position verharren, wird jetzt die Meinung vertreten, dass Melanozyten in der Lage sind, ihre Fortsätze zwischen den Keratinozyten zu bewegen, indem sie die Dendriten kontrahieren und zwischen den Keratinozyten neu positionieren. Somit ist es jedem Melanozyten möglich, mit nur drei bis vier Fortsätzen trotzdem mit mindestens 30 Keratinozyten Kontakt zu halten (PLONKA et al. 2009).

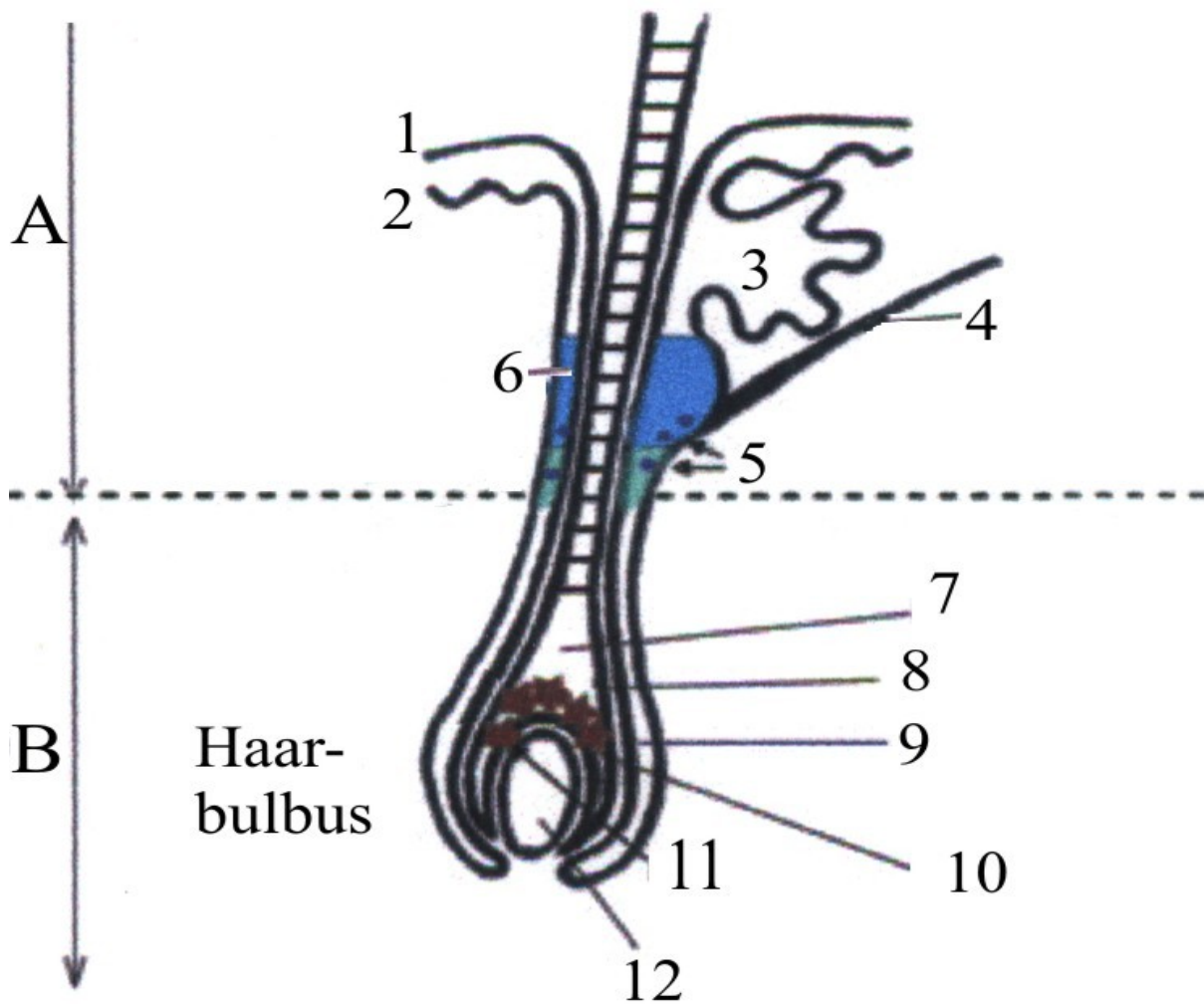
Aufgrund der Lage, der Produktion von Signalmolekülen und der Expression von verschiedenen Antigenen wird angenommen, dass Melanozyten noch weitere, noch nicht völlig verstandene Funktionen haben. Die Funktion als akzessorisch immunkompetente und sekretorische Zelle (PLONKA et al. 2009) wird diskutiert, da Melanozyten in Kultur in der Lage sind, immunologisch wichtige Oberflächenmoleküle zu exprimieren und Zytokine zu produzieren. Auch die strategisch günstige Position innerhalb der Haut und die Fähigkeit zur

Phagozytose lassen auf eine Rolle der Melanozyten in der Antigen-Aufnahme und Antigen-Präsentation schließen (LE POOLE et al. 1993). Die Expression der Lipocalin-Typ-Prostaglandin-D-Synthase (L-PDGS), die in anderen Hautzellen nicht vorkommt, kann möglicherweise eine Beteiligung des Melanozyten in der Regulation des Schlaf/Wach-Verhaltens bedeuten (PLONKA et al. 2009). L-PDGS produziert Prostaglandin D<sub>2</sub>, welche eine potente schlaf-induzierende Substanz ist (TAKEDA et al. 2007). Es ist auch vorstellbar, dass ein Verlust der L-PGDS Expression zur Nichterkennung seitens des Immunsystems führt. In diesem Zusammenhang kann der Verlust der L-PGDS-Expression vielleicht auch mit der Progression von Melanomen im Menschen in Verbindung gebracht werden. Es ist also auch möglich, dass die Expression von L-PGDS im Melanozyten zur Beibehaltung der Verteilung der Pigmentzellen in der Epidermis dient (TAKEDA et al. 2007). Eine endokrine/sensorische Funktion der Melanozyten und eine Funktion der Melanosomen als Chaperone wird ebenfalls in Betracht gezogen (PLONKA et al. 2009).

### *Haarfollikel*

Der Haarfollikel zählt zu den Hautanhangsorganen und besteht aus follikulären Keratinozyten, mesenchymalen Zellen und neuroektodermalen Zellen. Haarfollikelstammzellen sind multipotente Stammzellen der keratinozytischen Linie, die im Bulbusbereich jedes Haarfollikels lokalisiert sind. Sie tragen zur Regeneration der zyklischen Portion eines Haarfollikels in der Wachstumsphase bei (NISHIMURA 2011). Es existieren zwei unterschiedliche melanozytäre Populationen im Haarfollikel (s. Abb. 12). Einerseits sind dort die melanozytären Stammzellen lokalisiert, andererseits die differenzierte Nachkommenschaft dieser Stammzellen (LIN und FISHER 2007). Studien an der Maus haben ergeben, dass es sich bei den melanozytären Stammzellen um unreife Melano-

blasten handelt, ohne Pigmentproduktion, die im Bulbus und unterhalb des Bulbus lokalisiert sind. Histologisch stellen sich diese Zellen als klein und oval dar, mit kurzen und wenigen Dendriten, kleinen Melanosomen und sie sind DOPA negativ, d.h. sie produzieren keine Melaningranula. Diese Zellen versorgen die Haarmatrix mit einer großen Anzahl an einer sich differenzierenden melanozytären Nachkommenschaft (NISHIMURA et al. 2002).



**Abb. 12:** Schematische Darstellung eines Haarfollikels einer Maus mit Lokalisation der melanozytären Zellen (NISHIMURA 2011):

(A) permanenter Bereich, (B) zyklischer Bereich, (1) Epidermis, (2) Dermis, (3) Talgdrüse, (4) Musculus arrector pili, (5) melanozytäre Stammzellen (dargestellt als lila Punkte), (6) Haarfollikelstammzellen, (7) Haarschaft, (8) innere Wurzelscheide, (9) äußere Wurzelscheide, (10) Haarmatrix, (11) Melanozyten, (12) dermale Papille

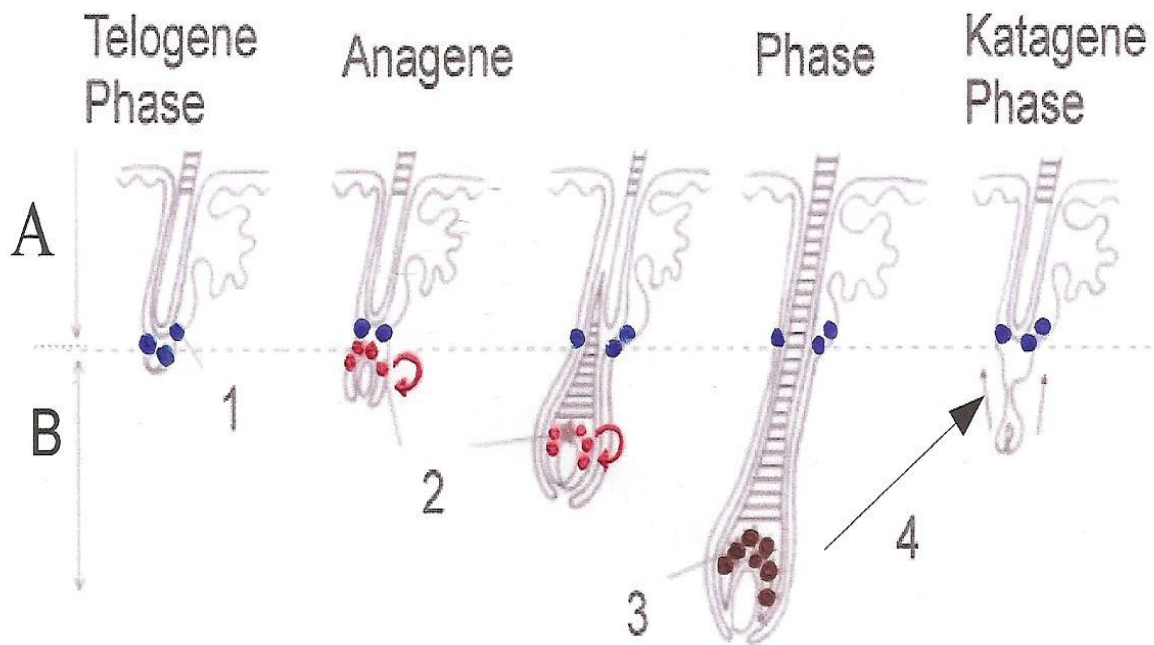
Die melanogenetisch aktiven Melanozyten formen mit den benachbarten unreifen präkortikalen Keratinozyten eine funktionelle Einheit („follikuläre Melanin Einheit“) (TOLLESON 2005, TOBIN et al. 1999).

Melanozyten im Haarbulbus unterscheiden sich in einigen Punkten von den epidermalen Melanozyten. Pigmentzellen im Haarbulbus sind größer und sie haben längere Dendriten als die Melanozyten in der Epidermis. Auch beinhalten sie einen ausgeprägteren Golgi-Apparat und endoplasmatisches Retikulum. Pigmentzellen im Haarbulbus produzieren 2-4 mal größere Melanosomen als ihre Verwandten in der Epidermis (ORFANOS und RUSKA 1968). Zusätzlich unterscheiden sich auch die funktionellen Einheiten voneinander. Während die „epidermale Melanin Einheit“ aus einem Melanozyten besteht, der ca. 36 Keratinozyten mit Melanin versorgt, besteht die „follikuläre Melanin Einheit“ aus einem Melanozyten, der ungefähr fünf Keratinozyten versorgt.

Der größte Unterschied ist aber, dass die Melaninproduktion der Melanozyten im Haarbulbus zyklischer Kontrolle unterliegt und eng mit dem Haarzyklus gekoppelt ist, währenddessen die Melanogenese im epidermalen Melanozyten kontinuierlich stattfindet (TOBIN et al. 1999).

Das Haar wächst zyklisch, beginnend mit der Wachstumsphase (anagenen Phase). Darauf folgt die katagene Phase, in der 70% eines Haarfollikels verloren gehen. Anschließend folgt die telogene Phase (TOLLESON 2005). Die melanozytären Stammzellen werden am Beginn der Wachstumsphase (anagenen Phase) eines Haarfollikels durch die Hochregulation einer Anzahl von Genen aktiviert. Der Zellkörper wird größer, und es kommt zur Ausbildung von Dendriten. Die Zellen beginnen sich zu teilen. In der Mitte der anagenen Phase gehen die Dendriten verloren. Die Melanoblasten schrumpfen und kehren ins Ruhestadium zurück. Die Nachkommenschaft differenziert in pigmentproduzierende Melanozyten, die in der Haarmatrix lokalisiert sind. Die differenzierten Melanozyten sterben durch Apoptose in der katagenen Phase ab, die Melanoblasten bleiben be-

stehen (s. Abb. 13) (NISHIMURA et al. 2002).



**Abb. 13:** Wachstumszyklus eines Haares unter Berücksichtigung der melanozytären Zellen (NISHIMURA 2011): (A) permanenter Anteil, (B) zyklischer Anteil. Melanozytäre Stammzellen (blaue Punkte) ruhen während der telogenen Phase. In der frühen anagenen Phase kommt es zur Reaktivierung der melanozytären Stammzellen. Die Nachkommenschaft (rote Punkte) der Stammzellen differenziert sich zu Melanozyten (braune Punkte), die die Haarmatrix besiedeln (dargestellt durch roten Pfeil). In der katagenen Phase bildet sich der zyklische Anteil des Haares zurück. Nur die melanozytären Stammzellen (blaue Punkte) verbleiben. (1) melanozytäre Stammzellen (blaue Punkte), (2) Nachkommenschaft, der melanozytären Stammzellen, welche sich in Melanozyten differenzieren und in die Haarmatrix wandern, (3) Melanozyten, (4) Regression des zyklischen Anteils des Haarfollikels

Eine Reihe von Studien hat erwiesen, dass es sich bei den amelanotischen Mela-



zyten, die sich beim Menschen im Haarfollikel in der äußeren Wurzelscheide befinden, ebenfalls um Melanoblasten handelt, die in der Lage sind, als zelluläres Reservoir zu dienen (NISHIMURA 2011). Epidermale Melanozyten proliferieren kaum. Die Melanoblasten im Haarfollikel dienen nicht nur als Reservoir für follikuläre Melanozyten, sondern auch für die epidermalen Melanozyten. Eine Repigmentierung eines unpigmentierten Hautbezirkes beginnt von den Haarfollikelöffnungen aus. Man spricht deshalb auch von der „follikulären Repigmentierung“ (NISHIMURA 2011).

### 2.2.3 Embryogenese

Alle Pigmentzellen der Säugetiere differenzieren sich aus der Neuralleiste, außer das Pigmentepithel der Retina, welches sich aus dem Augenbecher entwickelt. Die Neuralleiste besteht aus einer Population von Zellen, die einzigartig bei den Säugetieren ist. Die Neuralleiste selbst stammt vom dorsalen Neuralrohr ab (LE DOUARIN und DUPIN 2003).

Die Differenzierung der Zellen in der Neuralleiste verläuft schrittweise. Pluripotente Zellen teilen sich, um bipotente neural/glial und bipotente glial/melanogenetische Vorläuferzellen zu erzeugen. Die glial/melanogenetischen Vorläuferzellen teilen sich wiederum. Es entsteht ein Melanoblast und eine Glia-vorläuferzelle (THOMAS und ERICKSON 2008).

Es ist noch nicht völlig verstanden, warum sich welche Zelle welcher Linie anschließt. Die Position der Zellen in der Neuralleiste scheint Einfluss zu nehmen auf das Schicksal der Zellen. Die Zellen mit einer lateralen Lage in der Neuralleiste entwickeln sich in die neuronale Richtung. Die Zellen, die medial der neuronalen Vorläuferzellen liegen, schlagen u.a. die melanozytäre Richtung ein (SCHILLING und KIMMEL 1994). Auch ist noch nicht geklärt, ob alle Melanoblasten das pluripotente und bipotente Stadium durchlaufen, oder ob einige der Melanoblasten schon determiniert sind, wenn sie die Neuralleiste

erreichen (THOMAS und ERICKSON 2008). Es steht allerdings fest, dass mehrere Transkriptionsfaktoren dafür sorgen, dass die Melanogenese hochreguliert wird und so aus einer bipotenten glial/melanogenetischen Zelle ein determinierter Melanoblast entsteht. Einer der wichtigsten dafür verantwortlichen Transkriptionsfaktoren ist der Microphthalmia-associated transcription factor (Mitf). Weitere Transkriptionsfaktoren sind Pax3 und Sox10. Ein Verlust einer dieser drei Transkriptionsfaktoren hat ein Versagen der Melanoblastenbildung zur Folge (THOMAS und ERICKSON 2008).

Die Zellwanderung beginnt mit dem Schluss des Neuralrohrs. Melanoblasten wandern auf einem dorsolateralen Pfad zwischen den mesodermalen und ektodermalen Schichten aus. Die Wanderung wird von chemotaktischen Signalgradienten beeinflusst. Auch die Oberflächenmoleküle, die entweder dem Melanoblasten angehören oder innerhalb der extrazellulären Matrix liegen, durch die sich die Melanoblasten bewegen, haben Einfluss auf die Migration (TOLLESON 2005).

Aus der Neuralleiste wandern, während der ersten Stunden der Embryogenese der Melanozyten, entweder bipotente neuronale/glial Vorläuferzellen aus, oder determinierte Neuroblasten oder Glioblasten. Erst danach wandern bipotente glial/melanogenetische Vorläuferzellen und determinierte Melanoblasten aus (HENION und WESTON 1997).

Eine Reihe von Genen sind dafür verantwortlich, dass die Melanoblasten ihre Migration beenden und sich in Melanozyten differenzieren. Gene, die auf der Gewebsebene agieren, beeinflussen die Verteilung der Melanozyten im Gewebe. Sie kodieren meistens Transkriptionsfaktoren, Wachstumsfaktoren oder die Rezeptoren für diese Wachstumsfaktoren.

Gene, die auf dem zellulärem Level arbeiten, beeinflussen die Differenzierung von Melanoblasten zu Melanozyten. Auch spielen sie beim Überleben und der Proliferation der Pigmentzellen eine Rolle.

Gene, die auf der subzellulären Ebene funktionieren, sind nur spezifisch im Melanozyten anzutreffen. Dies sind Gene, die typische Melanosom-spezifische Proteine kodieren. In der nächsten Gruppe findet man Gene, die die Funktion der Melanozyten durch Umgebungsfaktoren beeinflussen. Sie modulieren die Funktion der Melanozyten und beeinflussen so die Pigmentproduktion. Die Proliferation und/oder Differenzierung von Melanozyten wird noch von weiteren Faktoren beeinflusst. Sie werden entweder vom Melanozyten selbst produziert oder von den Zellen in der Epidermis, wie z.B. den Keratinozyten oder den Langerhans-Zellen oder von den Zellen in der Dermis, wie z.B. Entzündungszellen, Endothelzellen oder Mastzellen. Einige regulieren welcher Melanintyp produziert wird, andere beeinflussen das Wachstum, die Dendritenbildung und die Migration der Melanozyten (HEARING 1999).

## **2.3 Melanozytäre Neoplasien des Menschen**

### **2.3.1 Übersicht der Einteilung der kutanen benignen melanozytären Neoplasien des Menschen**

Die kutanen benignen melanozytären Neoplasien gehen von Nävuszellen, epidermalen oder dermalen Melanozyten aus (LEVER und SCHAUMBURG-LEVER 1990 S. 756).

Das Wort „Nävus“ leitet sich vom lateinischen Wort „naevus“ für Leberfleck oder Muttermal ab (STRUNGS 2004). Der erste, der den Ausdruck Nävus zelle benutzte, war der Hamburger Dermatopathologe Paul Gerson Unna im Jahr 1893 (UNNA 1893). Lange war der Ursprung dieser Zellen unklar, bis THORNE und Mitarbeiter Tyrosinaseaktivität in den Nävuszellen feststellte und somit den melanozytären Ursprung dieser Zellen nachwies (THORNE et al. 1971). Sie treten in Nestern oder Zellverbänden auf, im Gegensatz zum einzeln stehenden Melanozyten (LEVER und SCHAUMBURG-LEVER 1990 S. 757). Der Mechanis-

mus, der für die Anordnung in Zellnestern verantwortlich ist, ist noch unbekannt (GONTIER et al. 2002).

Nävuszellen werden in drei Zelltypen unterteilt. Typ A bezeichnet epitheloide Zellen, die in der tiefen Epidermis und oberflächlichen Dermis liegen. In der Dermis selbst liegen Typ B Zellen, die eher lymphatischen Zellen ähneln. Typ C Zellen befinden sich in der tiefen Dermis, und sie sind üblicherweise länglich mit einem spindelförmigen Zellkern (MAGANA-GARCIA und ACKERMANN 1990). Heute wird darüber diskutiert, ob eine Unterscheidung zwischen Melanozyt und Nävus zelle noch zeitgemäß ist. Morphologische (beide Zelltypen besitzen Melanosomen und zytoplasmatische Fortsätze) und biochemische Gemeinsamkeiten (beide Zelltypen besitzen eine DOPA- und Tyrosinaseaktivität) lassen eine Unterteilung nicht mehr sinnvoll erscheinen (MOOI und KRAUSZ 2007 S. 9, LEVER und SCHAUMBURG-LEVER 1990 S. 762, MAGANA-GARCIA et al. 1990). Allerdings ist der Ausdruck Nävus zelle eine feste Größe in der Literatur und soll auch hier verwendet werden. Eine Studie hat gezeigt, dass es sich bei einem melanozytären Nävus um ein neoplastisches Geschehen handelt (HUI et al. 2001). Jede epidemiologische Studie, die sich mit der Anzahl von Nävi als Risikofaktor für die Entwicklung eines Melanoms beschäftigt hat, hat eine große Nävianzahl mit einem erhöhten Melanomrisiko verbunden (TUCKER und GOLDSTEIN 2003).

Es können kongenitale (angeborene) und erworbene melanozytäre Nävi unterschieden werden. Die letztgenannten unterteilt man in gewöhnliche und atypische melanozytäre Nävi (HAUSCHILD et al. 2006).

#### 2.3.1.1 Die erste Gruppe: gewöhnliche melanozytäre Nävi und Sonderformen

Die meisten Nävi sind erworben (ACKERMANN und MAGANA-GARCIA 1990) und erscheinen während der Kindheit oder Jugend. Die Anzahl der Nävi nimmt stetig bis zum Erwachsenenalter hin zu. Erwachsene in Mitteleuropa ha-

ben durchschnittlich 20 bis 30 gutartige melanozytäre Nävi mit einem Durchmesser von 2 mm oder mehr am gesamten Körper (WIECKER et al. 2003, LUTHER et al. 1996).

#### *Melanozytärer Nävus vom Junktionstyp*

Die definierenden Merkmale eines melanozytären Nävus vom Junktionstyp ist die Anwesenheit von Zellnestern, bestehend aus Nävuszellen in der dermoepidermalen Grenzzone. Zusätzlich kann eine lentigoähnliche Proliferation von einzelnen Melanozyten vorhanden sein. Eine intradermale Nävuskomponente fehlt. Die Zellnester haben eine regelmäßige runde bis ovale Form, ähneln einander stark und sind regelmäßig über die ganze Läsion verteilt. Die Nävuszellen sind meistens nicht-dendritisch und von runder oder polygonaler Gestalt (Typ A Zellen) (MOOI und KRAUSZ 2007 S. 55-57, LEVER und SCHAUMBURG-LEVER 1990 S. 757-758). Makroskopisch stellt sich dieser Typ als eine regelmäßige, runde bis ovale Makula dar, mit mittel- bis dunkelbrauner Pigmentierung (HAUSCHILD et al. 2006).

#### *Melanozytärer Nävus vom Compoundtyp*

Proliferation von Nävuszellen an der dermoepidermalen Grenzzone mit Beteiligung von intradermalen Nävuszellen. Die oberflächlicheren Zellen erscheinen mehr epitheloid (Typ A Zellen), mit reichlich Zytoplasma, welches manchmal Melanin enthält. Die tiefere Komponente besitzt im Allgemeinen eher kleine, ovale bis längliche Zellen (Typ B Zellen), die meistens nicht pigmentiert sind (MOOI und KRAUSZ 2007 S. 62, STRUNGS 2004, LEVER und SCHAUMBURG-LEVER 1990 S. 758-759). Makroskopisch sichtbar sind runde bis ovale, flache Papeln von hell- bis dunkelbrauner Pigmentierung (HAUSCHILD et al. 2006).

#### *Dermaler melanozytärer Nävus*

Hierbei handelt es sich um eine Proliferation von intradermalen Nävuszellen

ohne eine junktionale Komponente. Auch in größeren Nävi ist die intradermale Komponente zum größten Teil auf die papilläre Dermis beschränkt, obwohl eine Ausbreitung entlang der Adnexen vorkommen kann. Mehrere Faktoren müssen wahrscheinlich zusammenspielen, um den Verlust der junktionalen Komponente zu erklären. Der Stopp der Proliferation von Nävuszellen in der junktionalen Komponente mit Ausbreitung von Nävuszellen in die Dermis spielt möglicherweise eine Rolle. Ebenfalls denkbar ist sowohl ein Verlust von Nävuszellen durch die Aufwärtsbewegung der Epidermis, als auch ein Verlust von Nävuszellen über die Schweißdrüsen, oder die Nävuszellen der junktionalen Komponente gehen durch Apoptose verloren. Oberflächlicher gelegene Zellen ähneln dem Typ A, die gelegentlich Melanin enthalten können, tiefer gelegene Zellen sind eher vom Typ B (STRUNGS 2004, LEVER und SCHAUMBURG-LEVER 1990 S. 759-763, MOOI und KRAUSZ 2007 S. 62-70) Makroskopisch ist ein hautfarbener Knoten zu sehen, mit regelmäßiger Oberfläche und scharfer Begrenzung (HAUSCHILD et al. 2006).

#### *Nävi mit besonderen Lokalisationen*

Die Nävi der besonderen Lokalisationen unterscheiden sich in wenigen Punkten von den gewöhnlichen melanozytären Nävi und werden meistens gesondert angesprochen.

Akrale melanozytäre Nävi können überall an den Akren auftreten, auch an der Haut zwischen den Zehen und der Haut an den Füßen, mit welcher kein Gewicht aufgenommen wird. Typisch für akrale Nävi ist der Aufstieg von einzelnen Melanozyten, häufig im Zentrum der Läsion. Auch an den Nägeln können, aufgrund vieler Ursachen, pigmentierte Läsionen auftreten. Nävi der Genital- oder Perianalhaut zeigen, im Gegensatz zu den gewöhnlichen melanozytären Nävi, unregelmäßig geformte und unregelmäßig durchlöcherter junktionaler Zellnester. Auch hier sind einzelne aufsteigende Melanozyten nicht selten. Nävi

der Gesichtshaut penetrieren die Dermis oft bis in die tiefen Schichten der retikulären Dermis, also viel tiefer als andere Nävi. Die Nävuszellen sind häufig größer und eine begleitende Follikulitis ist nicht ungewöhnlich. Eine metaplastische Ossifikation im Bereich des Nävus kann ebenfalls auftreten (MOOI und KRAUSZ 2007 S. 71-74, STRUNGS 2004).

#### *Halonävus*

Klinisch präsentiert er sich als im Durchmesser 4-5 mm große braun-rote Papel, umgeben von einem unpigmentierten Ring. Meist sind Kinder oder junge Erwachsene betroffen. Der pigmentierte Bereich stellt sich als ein Nävus vom Junctionstyp oder vom Compoundtyp dar. Der Nävus ist umgeben und auch infiltriert von Lymphozyten und gegebenenfalls Histiozyten (WAYTE und HELWIG 1968). Die lymphohistiozytäre Reaktion führt zu einer Zerstörung der Nävuszellen. Im Laufe der Zeit kommt es zur Verkleinerung und letztendlich zum völligen Verschwinden des Nävus. Es bleibt ein weißer Fleck zurück, der nach Monaten oder Jahren wieder repigmentieren kann (HAUSCHILD et al. 2006).

#### *Ballonzellen Nävus*

Die Anwesenheit einiger einzelner oder kleiner Gruppen von Ballonzellen in melanozytären Nävi ist keine Seltenheit. Ein Ballonzellen Nävus besteht dagegen überwiegend aus großen Zellen, mit einem klaren oder fein vakuolisierten Zytoplasma. Der Nukleus ist für gewöhnlich klein, rund und zentral platziert. Die feine Vakuolisierung des Zytoplasmas beruht auf einer vakuolären Degeneration der Melanosomen. Eine junctionale Komponente kann vorhanden sein (STRUNGS 2004).

#### *Spitz Nävus*

Benannt ist dieser Nävus nach Sophie Spitz, die 1948 zytologische Aspekte für diesen Nävistyp unter dem ursprünglichen Namen „juvenile melanoma“ be-

schrieben hat (SPITZ 1948). Wie der Originalname schon andeutet, tritt der Spitz Nävus für gewöhnlich in der Kindheit oder Jugend auf. Klinisch sind die unterschiedlichsten Formen bekannt. Oft treten einzelne, halbkugelige Knötchen oder Knoten mit glatter Oberfläche von hellroter bis brauner Farbe auf. Die Größe variiert von wenigen Millimeter bis 2 cm (HAUSCHILD et al. 2006).

Die Spitz Nävi sind eine histologisch sehr variable Gruppe der benignen melanozytären Neoplasien. Der Spitz Nävus ist gut abgegrenzt und symmetrisch. Charakteristisch sind die großen Nävuszellen, die meistens epitheloid, spindelzellig, oder beides sein können. Die Nuklei und die Nukleoli sind ebenfalls prominent. Die Zellen sind in der dermoepidermalen Junktionszone oft in Nestern angeordnet. Einzelne Melanozyten in höheren Epidermislagen kommen nur selten vor. Ein weiteres typisches Merkmal ist die „Reifung“ der Melanozyten. Hierbei zeigen sich größere Zellen an der Junktionszone und in der oberen Dermis und kleinere Zellen an der Basis der Läsion. Ein weiteres diagnostisches Kennzeichen sind die sogenannten „Kamino bodies“. Das sind eosinophile Globuli, bestehend aus Basalmembranmaterial, die in der Epidermis oder Junktionszone zu finden sind (MOOI und KRAUSZ 2007 S. 97-99, HAUSCHILD et al. 2006, STRUNGS 2004).

#### *Gewöhnlicher Blauer Nävus*

Es wird angenommen, dass sich die Blauen Nävi mit ihren verwandten Läsionen aus dermalen Melanozyten entwickeln. Der Blaue Nävus erhielt seinen Namen aufgrund der bläulichen Farbe, die zu sehen ist, wenn die Läsion makroskopisch durch die intakte Haut betrachtet wird. Dieses Phänomen wird auf den Tyndall Effekt zurückgeführt, der durch die Lichtbrechung in den oberen Hautschichten die intradermale Pigmentation bläulich erscheinen lässt. (MOOI und KRAUSZ. 2007 S. 136). Makroskopisch stellt sich dieser Nävustyp als eine regelmäßig run-



de oder oval geformte Papel oder als ein auch Knoten dar, mit bläulicher Pigmentierung (HAUSCHILD et al. 2006). Ein Blauer Nävus besteht aus einer fokalen Proliferation aus pigmentierten dendritischen Melanozyten in der Dermis. Die Melanozyten sind dünn, fusiform oder länglich und sind meist deutlich pigmentiert. Im Allgemeinen besitzen sie lange, verzweigte Dendriten. Die Zellgröße variiert. Oft ist der Nukleus oval oder länglich. Eine junktionale Komponente fehlt in jeder Entwicklungsphase des Blauen Nävus völlig (MOOI und KRAUSZ 2007 S. 137, HAUSCHILD et al. 2006). Es gibt zahlreiche Varianten des gewöhnlichen Blauen Nävus.

#### 2.3.1.2 Die zweite Gruppe: Atypischer/dysplastischer melanozytärer Nävus

Ursprünglich wurde diese Läsion von Clark und Mitarbeitern unter dem Namen „B-K mole syndrome“ beschrieben (CLARK et al. 1978). Die Buchstaben B und K beziehen sich dabei auf den Anfangsbuchstaben zweier betroffener Familien, die multiple melanozytäre Läsionen aufwiesen, die sich aber klinisch und histologisch vom gewöhnlichen Nävus unterschieden (FRIEDMAN et al. 2009). In den folgenden Jahren wurde erkannt, dass diese ungewöhnlichen Nävi auch bei Einzelpersonen außerhalb von Melanomfamilien vorkommen. Deshalb wurde dann der Begriff des dysplastischen melanozytären Nävus eingeführt (HAUSCHILD et al. 2006). Der Begriff atypischer Nävus wurde 1992 von der Expertenkonferenz des National Institute of Health eingeführt. Trotz dieser Empfehlung konnte sich dieser Begriff nicht durchsetzen (FRIEDMAN et al. 2009). Der atypische Nävus gehört zu den erworbenen melanozytären Nävi, der sich aber in klinischen und histologischen Merkmalen von diesen abgrenzt. Klinisch lassen sich die atypischen Nävi nur schwer vom Melanom abgrenzen, weil sie einige klinische Merkmale des Melanoms aufweisen können. Es zeigen sich Überschneidungen bezüglich der „ABCD-Regel“ (assymetry, border irregularity,

colour variability, diameter >6 mm) (FRIEDMAN et al. 2009). Es gibt unterschiedliche klinische Definitionen des atypischen Nävus (FRIEDMAN et al. 2009). Eine der klinischen Klassifizierungen stammt von Kelly und Mitarbeitern. Es müssen von insgesamt fünf Kriterien (unregelmäßig verteilte Pigmentation, unklare oder unregelmäßig Begrenzung, Begleiterythema, Durchmesser von mehr als 5 mm), mindestens drei erfüllt werden, um eine Läsion als atypischen Nävus einstufen zu können (KELLY et al. 1997). Atypische melanozytäre Nävi treten vor allem bei jungen Erwachsenen auf, und die bevorzugte Lokalisation ist der Rumpf (FRIEDMAN et al. 2009, STRUNGS 2004). Unterschiedliche Studien legen verschiedene histologische Kriterien zur Definition eines atypischen Nävus fest (FRIEDMAN et al. 2009, STRUNGS 2004). Folgende histologische Kriterien können auf einen atypischen Nävus hindeuten: Präsenz einer ausgeprägten junktionalen (intraepidermalen) Proliferation von einzelnen, variabel geformten Zellnestern, bestehend aus Melanozyten, größtenteils entlang der dermoepidermalen Grenzzone. Oft kommt es zu anastomosierenden junktionalen Nestern (sog. „bridging“). Manche Melanozyten weisen große und pleomorphe Nuklei auf. In der Epidermis ist oft ein lymphohistozytäres Infiltrat zu finden (DE WIT et al. 1993). Wie schon keine Einigkeit bezüglich des Namens und der klinischen und histologischen Definition des atypischen Nävus herrscht, so ist auch die Bedeutung dieses Nävus umstritten. Viele epidemiologische Studien haben eine Verbindung zwischen atypischen Nävi und einem erhöhten Risiko einer Melanomentwicklung gefunden (FRIEDMAN et al. 2009). Einerseits ist bekannt, dass in atypischen melanozytären Nävi mit einer Wahrscheinlichkeit von 1 zu 200 bis 1 zu 500 maligne Melanome entstehen können (HAUSCHILD et al. 2006). Andererseits verhalten sich atypische Nävi in den meisten Fällen gutartig und entarten kaum zu malignen Melanomen (FRIEDMAN et al. 2009).

*Syndrom atypischer Nävi*

Das Syndrom atypischer Nävi (früher B-K mole syndrome) kann in einen familiären und einen sporadischen Typ unterteilt werden. Vom familiären Syndrom atypischer Nävi sind klassischerweise mehrere Familienmitglieder betroffen, die im Alter zwischen 20 und 60 Jahren erste maligne Melanome entwickeln. Das Melanomrisiko ist bei diesen Familienmitgliedern um das fünfhundertfache erhöht im Vergleich zur Normalbevölkerung. Häufig treten mehrere Melanome bei demselben Patienten auf. Allerdings treten Melanome nur bei denjenigen Familienmitgliedern auf, die das Syndrom atypischer Nävi aufweisen. Familienmitglieder ohne das Syndrom atypischer Nävi weisen kein erhöhtes Melanomrisiko auf. Vom sporadischen Syndrom atypischer Nävi spricht man, wenn kein anderes Familienmitglied betroffen ist. Auch hier besteht ein erhöhtes Melanomrisiko (HAUSCHILD et al. 2006).

### 2.3.1.3 Die dritte Gruppe: kongenitaler Nävus

Der kongenitale Nävus ist der einzige Nävistyp, dessen Erscheinen nicht mit der Exposition zum Sonnenlicht in Verbindung gebracht werden kann (MOOI und KRAUSZ 2007 S. 168). Er ist ab der Geburt vorhanden und kann je nach Durchmesser in klein ( $< 1,5$  cm), mittel (1,5 bis 19,9 cm) oder groß ( $> 20$  cm) eingeteilt werden (STRUNGS 2004). Patienten mit angeborenen Nävi, die 20 cm oder größer sind, haben ein erhöhtes Melanomrisiko (STRUNGS 2004). Der kongenitale Nävus kann eine junctionale, compound oder intradermale Komponente besitzen und Nävuszellen der Typen A, B oder C (STRUNGS 2004). Weitere charakteristische Merkmale sind die horizontale Verteilung der Melanozyten im Stratum reticulare der Dermis und das Vorhandensein von einzelnen Zellen in „Gänsemarschformation“ zwischen den kollagenen Bündeln. Sowohl die Verteilung von Melanozyten in oder um die ekkrinen Drüsen herum, als

auch die Präsenz von Melanozyten innerhalb der Septen sind spezifische Kriterien zur Diagnose eines kongenitalen Nävus (CRIBIER et al. 1999). Klinisch stellt sich dieser Nävus als scharf begrenzter, gleichmäßig hell- bis dunkelbrauner pigmentierter Fleck dar, der eine glatte Oberfläche und häufig eine verstärkte Behaarung aufweist (HAUSCHILD et al. 2006).

### 2.3.2 Klassische Einteilung der kutanen malignen Melanome des Menschen

Das maligne Melanom ist ein bösartiger Tumor, ausgehend vom melanozytären Zellsystem. Lokalisiert ist er hauptsächlich in der Haut (GARBE et al. 2005).

Die klassische Einteilung der malignen Melanome erfolgt in vier Hauptklassen:

#### 2.3.2.1 Superfiziell spreitendes Melanom (SSM)

Dieser Typ stellt die häufigste Form der malignen Melanome dar (DE BRAUD et al. 2003). Es sind vor allem Erwachsene betroffen. Hauptrisikofaktor ist eine exzessive intermittierende Sonnenexposition mit blasenwerfenden Sonnenbränden, die besonders während der Jugend auftreten. Auch präexistierende Nävi, eine positive Familiengeschichte mit betroffenen Familienmitgliedern (an einem Melanom erkrankte Geschwister oder Eltern) und ein heller Hauttyp, mit der Unfähigkeit zu Bräunen sind weitere Risikofaktoren. Klinisch stellt sich ein SSM als ein asymmetrischer Fleck dar, mit variabler Pigmentierung (braun, pink, rosa, blau-grau, schwarz mit hypopigmentierten Bereichen) (PORRAS und COCKEREII 1997). Die Tumorzellen von variabler Größe und Form sind einzeln oder in Nestern ungleichmäßig über die Epidermis verstreut (MOOI und KRAUSZ 2007 S. 287). Dieses Stadium der radialen Wachstumsphase kann Monate bis Jahre andauern. Während dieser Zeit ist die Prognose sehr gut (DE BRAUD et al. 2003).

Die Prognose verschlechtert sich, wenn Tumorzellen auch in den tieferen Teilen der Dermis gefunden werden (DE BRAUD et al. 2003).

#### 2.3.2.2 Lentigo maligna Melanom (LMM)

Ein LMM entwickelt sich aus einer Lentigo maligna. Sobald die Dermis betroffen ist, spricht man von einem LMM, da eine Metastasierung möglich ist, und es sich somit dann um einen malignen Prozess handelt (PORRAS und COCKEREII 1997).

Bei einer Lentigo maligna sind meist Menschen ab 50 Jahren mit einer hellen Haut betroffen, die einer erhöhten Sonnenexposition ausgesetzt waren. Kopf und Hals stellen die häufigsten Lokalisationen dar. Es handelt sich klinisch um allmählich grösser werdende, asymmetrische, unregelmäßig begrenzte Flecken, die häufig einen hypopigmentierten Bereich aufweisen. Für viele Jahre ist nur die Epidermis betroffen, deshalb handelt es sich bei der Lentigo maligna um einen gutartigen Prozess (PORRAS und COCKEREII 1997).

#### 2.3.2.3 Noduläres malignes Melanom (NMM)

Diese Neoplasie stellt sich als eine schnellwachsende, eher symmetrische ovale bis rundliche Papel oder auch als Knoten dar, mit regelmäßiger Begrenzung. Gewöhnlich ist sie schwarz oder grau. Eine Ulzeration der Oberfläche kann vorhanden sein (PORRAS und COCKEREII 1997). Dieser Tumor wächst gleich zu Beginn in die Tiefe, was die Prognose dieses Tumors verschlechtert (DE BRAUD et al. 2003, PORRAS und COCKEREII 1997).

#### 2.3.2.4 Akral lentiginöses Melanom (ALM)

Von dieser Form sind 5% der Kaukasianer betroffen. Allerdings ist dieser Tumor der häufigste bei Menschen mit dunkler Haut. Es handelt sich klinisch um einen variabel pigmentierten Fleck, mit irregulären Grenzen. Er tritt an Zehen, Handflächen und Fußsohlen (v.a. an der Ferse) auf (PORRAS und COCKEREII 1997). Auch an den Nägeln kann ein solcher Tumor lokalisiert sein. Die Pigmentierung geht vom Nagelbettepithel aus und bezieht den proximalen Nagelfalz und die Nagelhaut mit ein (Hutchinson's sign). Dabei handelt es sich um einen persistierenden Prozess, der sich oft über ein Jahr hinzieht. Die beibehaltene Pigmentierung des proximalen Nagelfalzes ist ein wichtiges diagnostisches Kriterium, da bei anderen Prozessen das dunkle Areal herauswächst und eine normale proximale Komponente zurücklässt (PORRAS und COCKEREII 1997, HUTCHINSON 1886).

#### *Varianten*

Zusätzlich zu den vier Haupttypen gibt es noch zahlreiche Varianten. Das desmoplastische Melanom stellt eine Sonderform dar, in der es histologische Merkmale ähnlich eines fibrosierenden Prozesses, oder ähnlich einer Weichteilneoplasie gibt. Häufig sind Hautlokalisationen betroffen, die durch eine lange Sonnenexposition ernsthaft verbrannt wurden. Oft sind Kopf und Nacken involviert. Makroskopisch ist ein hautfarbener Knoten zu sehen, der aber auch gegebenenfalls grau oder schwarz sein kann (PORRAS und COCKEREII 1997).

Eine weitere Variante ist das amelanotische maligne Melanom (AMM). 2-8% aller Melanome sind amelanotisch (ARIEL 1981, HUVOS et al. 1972, CLARK et al. 1969). Bei diesem Tumortyp fehlt das Pigment, welches normalerweise auf ein Melanom hindeutet. Amelanotische melanozytäre Tumorzellen sind zwar in der Lage, Melanin zu produzieren, allerdings ist

die Menge so gering, dass es in einem H.E.-Schnitt nicht gesehen wird (FITZPATRICK 1952). Unreife Melanosomen lassen sich elektronenmikroskopisch nachweisen (GIBSON und GOELLNER 1988). Wahrscheinlich ist, dass viele Abnormalitäten in der Expression von Schlüsselgenen für die Pigmentproduktion in einem einzelnen Phänotyp Ausdruck finden. AMM können an jeder Lokalisation auftreten. Man kann drei klinische Hauptpräsentationen unterscheiden. AMM an der sonnenexpositionierten Haut mit epidermalen Veränderungen, AMM an sonnenexpositionierter Haut, welches als hautfarbene dermale Plaque erscheint oder AMM, die sich als häufig erodierter, exophytischer Knoten darstellen (ADLER und WHITE 1997).

Wichtige prognostische Kriterien eines malignen Melanoms sind die vertikale Tumordicke nach Breslow (BRESLOW 1970), das Vorhandensein einer histologisch erkennbaren Ulzeration (GARBE et al. 2005), der Invasionslevel nach Clark (CLARK et al. 1969), der Nachweis von Mikrometastasierung in die regionalen Lymphknoten (GARBE et al. 2005) und das Geschlecht (eine signifikant schlechtere Prognose für Männer) (GARBE et al. 1995a).

### 2.3.3 Extrakutane Melanome des Menschen

Insgesamt entwickeln sich 4-5% aller primären Melanome nicht in der Haut, sondern an anderen Lokalisationen. Die Prognose ist meist sehr schlecht, da extrakutane Melanome spät entdeckt und spät vorgestellt werden. Außerdem erfolgt die Streuung über das Blut, im Gegensatz zu kutanen Melanomen, die eher lymphogen metastasieren und Metastasen im nächsten Lymphknoten bilden. Hier werden Metastasen v.a. in der Leber, aber auch in Haut, Lunge und im Gehirn gefunden. Mikroskopisch dominieren große, epitheloide Zellen, mit reichlich eosinophilem Zytoplasma, Spindelzellen oder kleine Zellen mit wenig

Zytoplasma. Extrakutane Melanome können in vier Hauptgruppen eingeteilt werden:

1. okulare Melanome (am häufigsten vorkommend)
2. Melanome der Mukosa
3. metastatische Melanome
4. Melanome anderer Organe (sehr selten)

Extrakutane Melanome können sich aus Melanozyten entwickeln. In manchen Organen ist der Ursprung dieser Tumore immer noch nicht geklärt. Es ist allerdings möglich, dass sie von Melanoblasten abstammen, welche die Mukosa, das Stroma und neurovaskuläre Bündel begleiten. Auch die Entwicklung aus neuroektodermalen Restzellen, die während der Embryogenese durch den Körper gewandert sind, ist möglich (HUSSEIN 2008).

#### 2.3.4 Beurteilung der Malignität

Eine Unterscheidung zwischen benignen melanozytären Nävi und malignen Melanomen kann sich sehr schwierig gestalten. Einige allgemeine Merkmale können auf die Malignität der Veränderung hinweisen. Ein Kriterium ist die irreguläre und asymmetrische Architektur eines Melanoms. Faszikulation, Wirbelbildung und die Bildung von Zellnestern sind häufig bei Melanomen. Ein trabekelartiges Muster, pseudoglanduläre oder pseudopapilläre Strukturen sind selten zu finden. Oft weisen primäre kutane Melanome eine intraepidermale Komponente auf. Auch die Wanderung von einzelnen atypischen Melanozyten oder sehr kleiner Zellgruppen nach oben, kann ein Zeichen der Malignität sein. Häufig ist eine epidermale Hyperplasie, oder aber auch ein Dünnerwerden der Epidermis zu beobachten. Eine fokale akantholytische Dyskeratose und eine epidermolytische Hyperkeratose kann eventuell ebenfalls gesehen werden. Die Architektur der dermalen Komponente kann fast jedes Muster annehmen.



Ein Kennzeichen der Malignität ist, dass sich das architektonische Muster innerhalb des Tumors plötzlich verändert, so dass verschiedene Zelltypen nebeneinander liegen (CLEMENTE et al. 1980). Veränderungen der Dermis weisen oft entzündliche Infiltrate (Lymphozyten, Langerhans-Zellen, Histiozyten oder Plasmazellen), Fibrose und vaskuläre Proliferation (RALFKIAER et al. 1987) auf. Mitotische Figuren sind häufig vorhanden. Melanome zeigen keine „Reifung“ oder „zoning“ im Gegensatz zu melanozytären Nävi. „Reifung“ eines Nävi bedeutet, dass die Zellgröße, die Zellkerngröße, der Pigmentationsgrad, die proliferative Aktivität und die Zellzahl innerhalb der intra-dermalen Komponente abnehmen (MOOI und KRAUSZ 2007 S. 62, 270).

### 2.3.5 Zellvarianten

Die Morphologie der Melanomzellen ist außergewöhnlich vielfältig. Folgende Tabelle 1 zeigt mögliche morphologische Zellvarianten (BANERJEE und HARRIS 2000):

**Tab. 1:** Morphologische Zellvarianten des Melanoms (BANERJEE und HARRIS 2000)

Kriterium	Morphologie	Erläuterung
<i>Zellgröße</i>	große Zellen	pleomorph
	kleine Zellen	häufig monomorphe Zellen mit wenig Zytoplasma
<i>Zellform</i>	polygonal	am häufigsten
	spindelzellig	
	dendritisch	

<i>Zytoplasma</i>	Zellen mit klarem Zytoplasma	
	Siegelringzellen	selten, entsteht durch eine Akkumulation von Vimentin-Filamenten, die den Nukleus an die Peripherie drängen. Dadurch entsteht eine semilunare Form der Zelle.
	pseudolipoblastische Zellen	mit multiplen leeren Vakuolen
	rhabdoide Zellen	mit glasigen, hyalinen Einschlüssen, mit rundem oder irregulären Nukleus und einem prominenten Nukleolus
	Ballonzellen	große, polygonale oder runde Zellen, viel Zytoplasma, Kern zeigt mäßigen Hyperchromatismus, 1-2 Nukleoli vorhanden
<i>phagozytiertes Material</i>	hyaline eosinophile PAS + Globuli	am häufigsten, genaue Herkunft ist unbekannt, aber es könnte sich um phagozytiertes zelluläres Material aus untergegangenen Zellen handeln
	Erythrozyten	
	neutrophile Granulozyten	
	andere Tumorzellen	extrem selten

<i>Zellkern</i>	polynukeär	zwei oder mehrere Zellkerne
	Lobulation	
	plasmazytoide Merkmale	unauffälliger, exzentrisch gelegener Nukleus, mit einer blassen paranukleären Zone, grobkörniges Chromatin, reichlich Zytoplasma, selten vorkommend
	zytoplasmatische Einschlüsse innerhalb des Zellkerns	häufig, gilt als ein diagnostischer Hinweis. Abhängig von der Schnittebene führen die zytoplasmatischen Einschlüsse zu einer hufeisenartigen Form des Nukleus, oder es entsteht eine intranukleäre Pseudoinkusion
	nukleäre Furchung und Angulation	selten

## 2.4 Melanozytäre Neoplasien des Hundes

### 2.4.1 Allgemeines

Die Angaben in der Literatur bezüglich der Inzidenz der melanozytären Neoplasien des Hundes reichen von 3 bis 7% (GROSS et al. 2005 S. 815 und 825, MEUTEN 2002 S. 427, SMITH et al. 2002, GOLDSCHMIDT 1994). Häufig betroffene Hunderassen sind der Scottish Terrier, Miniatur und Standard Schnauzer, Irish Setter und der Golden Retriever (RAMOS-VARA et al. 2000, GOLDSCHMIDT 1994) oder der Golden Retriever, Labrador Retriever, Chow Chow, Cocker Spaniel und der Deutsche Schäferhund (SCHULTHEISS 2006). Die Auflistung unterschiedlicher Rassen wird dadurch

erklärt, dass sich die Popularität der Hunderassen im Laufe der Zeit verändert hat. Es wird angenommen, dass sich die beliebtesten Hunderassen (Labrador Retriever, Golden Retriever, Deutscher Schäferhund), die mit einer hohen Anzahl von Hunden vertreten sind, deshalb auch hohe Erkrankungsraten aufweisen. Weniger beliebte Hunderassen wie der Chow Chow, Rottweiler und Cocker Spaniel erscheinen dagegen eher überrepräsentiert und andere beliebte Hunderassen unterrepräsentiert. Dies spiegelt evtl. verschiedene genetische Prädispositionen in der Entwicklung eines Melanoms wider (SCHULTHEISS 2006). Das Alter der Hunde, die ein Melanom entwickeln, liegt im Durchschnitt bei zehn Jahren (SCHULTHEISS 2006, KOENIG et al. 2001, GOLDSCHMIDT 1994). Eine Geschlechtsdisposition für das maligne Melanom existiert nicht (GOLDSCHMIDT 1994). Melanozytäre Tumore kommen in der Maulhöhle, der Haut, Zehe, Lippe und am Auge vor (SMITH et al. 2002, BOLON et al. 1990). Sehr selten werden Melanome auch am Anus und im perianalen Bereich gefunden (KIM et al. 2005). Die Lokalisation hat in Hinsicht auf das klinische Verhalten eine große Bedeutung. Melanome der Maulhöhle und an der Krallen sind sehr häufig maligne, währenddessen melanozytäre Tumore, die an der behaarten Haut lokalisiert sind, oft benignes Verhalten zeigen (SCHULTHEISS 2006, SMITH et al. 2002, BOLON et al. 1990). Auch melanozytäre Tumore am Augenlid und an der Vordergliedmaße sind häufig gutartig (GOLDSCHMIDT 1994). Klinisch stellt sich das Melanom variabel dar. Es kann grau, braun, schwarz, rot oder sogar dunkelblau gefärbt sein. Allerdings ist die Pigmentation kein spezifisches Merkmal, weil andere Neoplasien phänotypisch dem Melanom ähneln können. Die Tumore haben eine durchschnittliche Größe von 1-3 cm. Ihre Form kann glatte, kugelförmige, ungestielte Knoten, polypoide, plaqueähnliche oder sogar lobulierten Massen beinhalten. Größere Tumore weisen häufig Ulzerationen auf. Die Tumore sind schlecht abgegrenzt und nicht eingekapselt. Das Wachstum ist häufig infiltrativ (SMITH et al. 2002).

#### 2.4.2 Orale Melanome des Hundes

Melanome sind eine der am häufigsten diagnostizierten Neoplasien in der Maulhöhle des Hundes (TAIXEIRA et al. 2010, SMITH et al. 2002, GOLDSCHMIDT 1994). Erhöhtes Risiko für die Entwicklung eines Melanoms in der Maulhöhle besteht bei einer stark pigmentierten Maulschleimhaut (GOLDSCHMIDT 1985, HOYT und WITHROW 1984). Am häufigsten sind orale Melanome an der Gingiva lokalisiert (SPANGLER und KASS 2006). Gefolgt von der labialen bzw. bukkalen Mukosa, Gaumen, Zunge und Pharynx (SPANGLER und KASS 2006). Klinische Anzeichen eines oralen Melanoms sind Dysphagie, Halitose, Ptyalismus und Blutungen. Melanome können die Mandibula infiltrieren und dort eine Knochenlyse verursachen und gegebenenfalls eine Fraktur des Unterkiefers auslösen (SMITH et al. 2002). Melanome der Maulschleimhaut wachsen schnell, invasiv und metastasieren früh in ihrer Entwicklung in regionale Lymphknoten und entfernte Organe. Häufig ist die Lunge betroffen. Außerdem ist die Rezidivrate nach einer chirurgischen Entfernung sehr hoch (TAIXEIRA et al. 2010, BERGMAN 2007, SMITH et al. 2002, RAMOS-VARA et al. 2000). Eine neue Studie stellt allerdings die in der Literatur fest verankerte Aussage, dass alle, oder zumindest fast alle, oralen Melanome maligne sind, in Frage. Obwohl die Hunde mit einem oralen Melanom die höchste Mortalitätsrate aufwiesen, waren 12% (9/73) der Hunde mit der Diagnose „orales Melanom“ nach 1065 Tagen noch am Leben. Ein prognostisches Modell, vorgestellt in dieser Studie, welches die nukleäre Atypie berücksichtigt, hat in dieser Studie eine Treffsicherheit von 92,5% (SPANGLER und KASS 2006).

### 2.4.3 Klassifizierung der melanozytären Neoplasien des Hundes

Die Terminologie für melanozytäre Neoplasien ist in der Humanmedizin und in der Veterinärmedizin sehr unterschiedlich. Das kann darauf zurückgeführt werden, dass in der Humanmedizin Melanome häufig vom SSM Typ sind, d.h. kleine Massen, die meist auf die Epidermis und Dermis beschränkt sind, während sich Melanome in der Veterinärmedizin eher als fortgeschrittenere invasive Umfangsvermehrungen darstellen (SMITH et al. 2002). Nävuszellen sind in der Tierhaut nicht identifiziert worden, außer beim Primaten. Der Terminus Nävus wird in der Tiermedizin als Synonym für ein Hamartom verwendet und hat somit nichts mit melanozytären Neoplasien zu tun (GOLDSCHMIDT 1994).

#### 2.4.3.1 Benigne melanozytäre Tumore

##### 2.4.3.1.1 Lentigo

Die Lentigo ist eine Proliferation der Melanozyten, die gewöhnlich auf die Epidermis beschränkt ist. Klinisch ist ein pigmentierter, abgegrenzter Fleck (GINN et al. 2007 S. 760) mit einem Durchmesser von weniger als 5 mm zu sehen. Diese Läsionen sind eher zufällige Funde (GROSS et al. 2005 S. 814). Sie werden zumeist als Hyperplasie von Melanozyten angesehen und nicht als ein neoplastisches Geschehen gewertet (GINN et al. 2007 S. 760). Histologisch sind zahlreiche Melanozyten als Einzelzellen entlang der basalen Epithelzellen zu sehen. Sie sind reichlich pigmentiert und erscheinen dadurch vergrößert, ansonsten weisen sie keine histologischen Veränderungen auf. Die epidermalen Keratinozyten sind ebenfalls hyperpigmentiert (GROSS et al. 2005 S. 814).

#### 2.4.3.1.2 Melanozytom

Histologisch werden Melanozytome in junktionale, compound und dermale Typen eingeteilt. Sie bestehen aus Spindelzellen, runden bis polygonalen Zellen, epitheloiden Zellen, dendritischen Zellen oder auch Ballonzellen. Es können ein Zelltyp oder auch mehrere Zelltypen innerhalb eines Tumors auftreten. Spindelzellen sind oft in Nestern oder Bündeln angeordnet, die neurale Strukturen simulieren. Runde bis polygonale Zellen sind für gewöhnlich in Schichten oder dichten Zellpaketen arrangiert. Epitheloide Zellen sind rundlich und in Schichten oder größeren Nestern angeordnet, während dendritische Zellen eher kleine Nester formen. Die Zellen eines Melanozytoms weisen generell einen vergrößerten Nukleus mit einem kleinen Nukleolus auf. Die Form des Nukleus ist rund bis oval. Mitotische Figuren sind bei allen Zelltypen nur selten zu finden. Der Pigmentgehalt variiert stark. Typischerweise weisen Melanozytome wenig bis mäßiges stromales Kollagen auf. Ulzeration oder kleine nekrotische Bereiche können vorhanden sein. Melanophagen können in variabler Anzahl präsent sein. Oft kommen sie in kleinen Gruppen vor. Lymphozyten und Plasmazellen sind ebenfalls zu finden (GROSS et al. 2005 S. 817-818).

##### *Junktionales Melanozytom*

Diese Läsion ist auf die Epidermis und den dermoepidermalen Grenzbereich beschränkt. Theoretisch kann sie beim Hund auftreten, allerdings wurde sie noch nicht beschrieben. Der Grund hierfür kann sein, dass einzelne makuläre Läsionen durch das Fell schwierig zu entdecken sind und nur selten biopsiert werden (GROSS et al. 2005 S. 815-816).

*Compound Melanozytom*

Dieser Tumor betrifft die Epidermis und Dermis, und er wird am häufigsten beim Hund gefunden. Der Tumor stellt sich als ein einzelnes, umschriebenes, braunes bis schwarzes, nicht behaartes Knötchen dar, mit einem Durchmesser von weniger als 1 cm. Besonders häufig betroffene Lokalisationen sind der Rumpf und der Kopf, hier besonders die Augenlider und die Schnauze (GROSS et al. 2005 S. 816).

*Dermales Melanozytom*

Diese Läsion ist auf die Dermis beschränkt. Sie erscheint als einzelne, umschriebene, unbehaarte, blau-schwarze Umfangsvermehrung, mit einem Durchmesser von 0,5 bis 4 cm. Häufig sind sie am Rumpf zu finden und an den Extremitäten, v.a. zwischen den Zehen (GROSS et al. 2005 S. 816).

*Ballonzellen-Melanozytom*

Diese Neoplasie ist oft auf die Dermis beschränkt. Histologisch herrschen große, runde Zellen vor. Wenige fusiforme oder polygonale Melanozyten können vorhanden sein. Das Zytoplasma erscheint blass und ist im Allgemeinen fein granulär. Meist ist kein Melaninpigment zu erkennen. Die Nuklei sind klein. Mitotische Figuren sind selten zu sehen (GROSS et al. 2005 S. 820-821).

*Melanozytom-Acanthom*

Diese Neoplasie ist ein sehr selten auftretender gemischter Tumor, bestehend aus einer benignen melanozytären Proliferation, die einem compound Melanozytom ähnelt und einer benignen epithelialen Proliferation (GROSS et al. 2005 S. 822). Die Pathogenese dieses Tumors ist unbekannt. Histologisch ist die epitheliale Komponente charakterisiert durch anastomosierende Trabekel aus kleinen Keratinozyten mit peripherer Palisadenbildung. Es sind zystische Strukturen von unterschiedlicher Größe vorhanden, die formloses oder geschichtetes



Keratin enthalten. Manchmal kommen auch größere Zysten vor. Die meisten Keratinozyten haben mäßiges, glasiges, schwach rötliches Zytoplasma. Die Nuklei sind blass und oval mit unauffälligen Nukleoli. Die melanozytäre Komponente besteht aus zahlreichen Nestern und Gruppen von polygonalen oder spindelzelligen Melanozyten. Sie sind entlang der Peripherie der epithelialen Trabekel lokalisiert. Sie zeigen wenig bis mäßig viel Zytoplasma, mit z.T. reichlich Melanin. Die Nuklei sind klein, oval und euchromatisch. Die Nukleoli sind unauffällig. Mitotische Figuren sind nicht vorhanden (GROSS et al. 2005 S. 822-824).

#### 2.4.3.2 Maligne Melanome des Hundes

Im Allgemeinen sind die Epidermis und die Dermis oder die Dermis alleine betroffen. Große Tumormassen können sich bis in die Subkutis hinein erstrecken. Ulzeration und Nekrose sind häufig anzutreffen. Durch die Nekrose der Tumorzellen kommt es zur Pigmentinkontinenz. Melanophagen können in der ganzen Neoplasie zu sehen sein. In der Peripherie sind manchmal Lymphozyten und Plasmazellen zu entdecken (GROSS et al. 2005 S. 826-827).

Ein Hinweis auf ein malignes Geschehen gibt die Lokalisation des Tumors (s. 2.4.1). Weitere Merkmale der Malignität sind drei oder mehr mitotische Figuren pro Gesichtsfeld und bestimmte zytologische Kriterien, wie große Nuklei, Variationen in der Nukleusgröße und -form, Hyperchromasie, abnormale Chromatinverklumpungen, ein oder mehrere Nukleoli und atypische mitotische Figuren. Tumorzelleinbrüche in lymphatische oder Blutgefäße und, bei den oralen Melanomen, Metastasen im mandibulären Lymphknoten sind ein eindeutiges Merkmal für einen bösartigen Prozess (SMITH et al. 2002). Runde bis polygonale Tumorzellen mit Pigmentgranula werden als eher benigne angese-

hen. Spindelzellige oder epitheloide Zellen mit klarem Zytoplasma ohne Pigmentablagerungen werden dagegen als maligne eingestuft (OYAMADA et al. 2007).

Maligne Melanome können wie folgend histologisch nach dem dominanten Zelltypen eingeteilt werden (SPANGLER und KASS 2006).

#### 2.4.3.2.1 Epitheloides Melanom

Epitheloide Tumorzellen sind rund, mit diskreten Zellgrenzen, mit reichlich, schwach eosinophilem Zytoplasma und einem großen Zellkern und einem prominenten Nukleolus (GROSS et al. 2005 S. 827). Die Tumorzellen können einzeln vorkommen, oder in kleinen Klustern (SMITH et al. 2002). Gegebenenfalls sind auch größere Zellnester zu finden. Anisokaryose und unterschiedliche Chromatinmuster können ebenfalls vorkommen (GROSS et al. 2005 S. 827)

#### 2.4.3.2.2 Spindelzelliges Melanom

Die Spindelzellen sind in Schwärmen oder Bündeln angeordnet (GROSS et al. 2005 S. 827, SMITH et al. 2002), welche neuralen Strukturen ähneln können. Die Nuklei sind plump und fusiform. Nukleärer Pleomorphismus ist zu beobachten. Die Nukleoli sind zu erkennen und können prominent erscheinen. Das Zytoplasma ist wenig definiert (GROSS et al. 2005 S. 827)

#### 2.4.3.2.3 Gemischter Typ

Diese Tumore bestehen aus epitheloiden Zellen und Spindelzellen (SMITH et al. 2002).

#### 2.4.3.2.4 Dendritische Form

Diese Tumorzellen besitzen eine sternförmige Gestalt, häufig sind auch lange zytoplasmatische Fortsätze zu sehen. Die Nuklei sind oval bis länglich (GROSS et al. 2005 S. 827).

Weitere, selten vorkommende Varianten wurden beschrieben:

#### 2.4.3.2.5 Ballonzellen Melanom (= clear cell typ melanoma) (SMITH et al. 2002)

Diese Tumore bestehen hauptsächlich oder zumindest zum größten Teil aus Ballonzellen. Die Zellen sind rund oder polygonal, besitzen ein klares oder leicht eosinophiles Zytoplasma. Die Zellkerne sind rund, hauptsächlich in der Peripherie lokalisiert und können einen leichten bis mäßigen Pleomorphismus aufweisen. Gewöhnlich ist ein zentral gelegener Nukleolus vorhanden. Zellgruppen sind durch kollagene Septen voneinander getrennt (WILKERSON et al. 2003, SMITH et al. 2002, CANGUL et al. 2001, RAMOS-VARA et al. 2000).

#### 2.4.3.2.6 Siegelringzellen Melanom

Diese Tumorzellen sind rund bis oval, mit reichlich, schwach eosinophilem Zytoplasma. Der Zellkern ist vesikulär, halbmondförmig und in der Peripherie lokalisiert, was den Zellen das Aussehen eines Siegelrings gibt (SMITH et al. 2002, CANGUL et al. 2001).

#### 2.4.3.2.7 Adenomatöse/papilläre Zellen

RAMOS-VARA und Mitarbeiter beschreiben ein orales Melanom mit polygonalen Zellen mit einer adenomatösen/papillären Erscheinungsform. Die Zellen sind in Strängen angeordnet (RAMOS-VARA et al. 2000).

#### 2.4.3.2.8 Knorpelartige und/oder osteoide Formation

In einer retrospektiven Studie wurden von 197 kaninen oralen malignen Melanomen 12 Fälle mit Teilbereichen mit knorpelähnlichen Strukturen und 3 Exemplare mit z.T. osteoidähnlichen Formationen gefunden. Die Autoren gehen davon aus, dass neoplastische Melanozyten myxoide Substanzen produzieren können, welche die Zellen letztendlich einschließen und sich dann allmählich Freiräume um den Zellkörper bilden, ähnlich den Knorpellakunen. Für die Bildung von osteoidähnlichen Strukturen wird ein anderer Mechanismus verantwortlich gemacht. Melanozytäre Tumorzellen können nach Ansicht der Autoren auch ein dichtes verbindendes Material produzieren, aus der die osteoide Matrix entsteht (OYAMADA et al. 2007).

### **2.5 Differentialdiagnosen für das maligne Melanom des Hundes**

Besonders amelanotische Melanome können sehr schwierig zu diagnostizieren sein. Fehlendes Pigment und die morphologische Vielgestalt der Tumorzellen können die Diagnose erschweren (SMITH et al. 2002). Tabelle 2 listet mögliche Differentialdiagnosen für das kanine Melanom mit Literaturangaben auf.

**Tab. 2:** Mögliche Differentialdiagnosen mit Literaturangabe

Melanozytom	SMITH et al. 2002
Pigmentierte Läsionen der Epidermis und der Adnexen (Trichoblastom, Trichoepitheliom, Pilomatrikom, Tumore der Talgdrüsen und apokrine Neoplasien)	SMITH et al. 2002
Lentigo simplex	SMITH et al. 2002
Benigne und maligne histiozytäre Neoplasien	FERNANDEZ et al. 2005, SMITH et al. 2002, SANDUSKY et al. 1987
Plasmozytome	SMITH et al. 2002, SANDUSKY et al. 1987
Schlecht differenzierte Mastzellentumore	FERNANDEZ et al. 2005, SMITH et al. 2002, SANDUSKY et al. 1987
Karzinome	SMITH et al. 2002, RAMOS-VARA et al. 2000, SANDUSKY et al. 1987
Reaktives Gewebe	SMITH et al. 2002
Hämangioperizytome	SMITH et al. 2002
Mesenchymale Tumore (abstammend von Fibroblasten, glatten Muskelzellen, Skelettmuskelzellen, neuralen Strukturen)	SMITH et al. 2002, SANDUSKY et al. 1987
Sarkome	RAMOS-VARA et al. 2000
Lymphome	FERNANDEZ et al. 2005, SMITH et al. 2002, RAMOS-VARA et al. 2000, SANDUSKY et al. 1987
Osteosarkome	RAMOS-VARA et al. 2000

## **2.6 Diagnosemöglichkeiten des malignen Melanoms**

### **2.6.1 Enzymnachweise**

#### *Tyrosinase-DOPA-Reaktion*

Diese Reaktion stellt die Präsenz von Tyrosinase fest. Bei Melanomen führt die positive DOPA-Reaktion zu einem braun-schwarzen Reaktionsprodukt im Zytoplasma der Tumorzellen. Diese Reaktion kann allerdings meistens nur bei amelanotischen Melanomen gesehen werden. Der große Nachteil dieses Testes ist, dass dazu frisches Gewebe benötigt wird (SMITH et al. 2002). Außerdem ist eine sehr gewissenhafte Präparation der chemischen Lösungen notwendig, um ein optimales Ergebnis zu erzielen (WICK und PATTERSON 2003).

Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase, Laktat-Dehydrogenase,  $\beta$ -Hydroxybutyrat, saure Phosphatase und  $\beta$ -Glucuronidase stellen weitere Enzyme dar, die nachgewiesen werden können. Jedes dieser Enzyme kann in melanozytären Neoplasien gefunden werden. Sie kommen aber auch bei anderen Tumorenarten vor (WICK und PATTERSON 2003).

### **2.6.2 Nachweis von Glykogen**

#### *Perjodsäure-Schiff-Reaktion (PAS-Reaktion)*

Mit der Perjodsäure-Schiff-Reaktion soll Glykogen nachgewiesen werden. NOWAK und Mitarbeiter konnten in ihrer Studie bei allen getesteten Melanomen und Nävitypen die Präsenz von Glykogen mittels dieser Färbung nachweisen. Allerdings ist das Vorkommen von Glykogen nicht auf das Melanom beschränkt, sondern zahlreiche andere Tumorarten weisen dieses Merkmal ebenfalls auf (NOWAK et al. 1998). In weiteren Studien war die PAS-Reaktion unzuverlässig, mit sowohl positiven als auch negativen Ergebnissen (WILKERSON et al. 2003, CANGUL et al. 2001).

## 2.6.3 Histochemische Nachweismethoden für Melanin oder andere Pigmente

### 2.6.3.1 Fontana-Masson-Färbung

Melanin und andere neuroendokrine Granula binden und reduzieren Silberionen und produzieren dabei schwarze metallische Silberausfällungen (WICK und PATTERSON 2003). Diese Methode ist unspezifisch, da andere Substanzen, z.B. Lipofuscin ebenfalls eine Reaktion auslösen können (SMITH et al. 2002).

### 2.6.3.2 Schmorls Technik zum Nachweis für reduzierende Substanzen

Reduzierende Substanzen im Gewebe sind unter anderem Melanin und einige neuroendokrine Granula. Sie besitzen reduzierende Eigenschaften, so dass sie in der Lage sind, Kaliumferricyanid in Kaliumferrocyanid umzuwandeln. Dieses bildet in der Gegenwart von dreiwertigem Eisen Berliner Blau. Diese Methode ist ebenfalls relativ unspezifisch, wobei man die Färbung von neuroendokrinen Granula eventuell vermeiden kann. Durch die Postfixation von formalinfixiertem Gewebe in absolutem Alkohol werden die neuroendokrinen Granula zerstört, die Melaninpigmente bleiben aber erhalten (WICK und PATTERSON 2003).

## 2.6.4 Immunzytochemie

Sechs kanine Melanome und acht regionale Lymphknoten wurden immunzytochemisch mit S100 und MelanA getestet. Um die Spezifität der Reaktion zu überprüfen, wurden zusätzlich epitheliale und mesenchymale Tumore, rundzellige Neoplasien und normales Gewebe getestet. Alle Tumore mit den dazugehörigen Lymphknoten zeigten eine Reaktion mit MelanA und S100. Allerdings war die Spezifität für S100 gering. Dagegen zeigte MelanA eine schwache zytoplasmatische Reaktion in zwei von drei Plattenepithelkarzinomen,

die sich deutlich von der positiven Reaktion in Melanomen unterscheidet (HÖINGHAUS et al. 2002).

## 2.6.5 Nachweis von genetischen Abnormalitäten

### 2.6.5.1 Comparative genomic hybridization (CGH)

Genetische Kriterien können ebenfalls zur Melanomdiagnose herangezogen werden. In einer Studie von BASTIAN und Mitarbeitern wurden 186 melanozytäre Tumore auf Abweichungen in der Anzahl von DNA-Kopien untersucht. 96,2% der Melanome zeigten irgendeine Form von chromosomaler Abweichung (BASTIAN et al. 2003). Dagegen entstehen die meisten Nävi durch Punktmutationen (GERAMI und ZEMBOWICZ 2011). Allerdings wiesen Spitz-Nävi und noduläre Proliferationen innerhalb kongenitaler Nävi ebenfalls chromosomale Abweichungen auf, die sich aber von denen der Melanome unterschieden (BASTIAN et al. 2003). Dies lässt den Schluss zu, dass der Mechanismus für die Genominstabilität in den verschiedenen Tumortypen unterschiedlich ist (GERAMI und ZEMBOWICZ 2011). Die Nachteile der CGH sind der enorme Zeit-, Labor- und Kostenaufwand (GERAMI und ZEMBOWICZ 2011, MOREY et al. 2009). Ein weiterer Nachteil ist die Möglichkeit eines falsch negativen Ergebnisses, wenn im Melanom eine dominierende Nävikomponente vorhanden ist. Vorteile dieser Methode sind, dass ein positives Ergebnis fast ohne Zweifel ein Melanom diagnostiziert und außerdem kann nach allen Formen von chromosomalen Abweichungen in einem einzigen Experiment gesucht werden (GERAMI und ZEMBOWICZ 2011).



#### 2.6.5.2 Fluorescence in situ hybridization (FISH)

FISH-Protokolle spüren ebenfalls genetische Abnormalitäten in den Tumorzellen auf. Kurze DNA-Fragmente (Sonden) werden auf einen 5µm dicken, formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Tumorgewebeschnitt übertragen. Die Anzahl der Sonden ist auf vier beschränkt, da die zur Verfügung stehenden Fluorochrome überlappende Wellenlängen besitzen. Deshalb können in einem einzelnen FISH-Test nur maximal vier chromosomale Ziele untersucht werden. Nichtgebundene fluoreszierende DNA wird weggespült. Die Beurteilung unter dem Fluoreszenzmikroskop gibt die Option, individuelle Tumorzellen in verschiedenen Bereichen der Läsion zu beurteilen und die Ergebnisse mit dem der Lichtmikroskopie zu vergleichen. Jedes mit einem Fluorochrom versehene DNA-Fragment, welches mit einem Chromosom im Tumorzellkern hybridisiert ist, erscheint als ein, in einer bestimmten Farbe, fluoreszierender Punkt. Jeder Punkt identifiziert eine einzelne Kopie des chromosomalen Locus mit der jeweiligen homologen DNA. Im Idealfall bindet der diploide Kern 2 Sonden, so dass zwei fluoreszierende Punkte im Zellkern sichtbar sind. Wenn die DNA-Region von Interesse im Zellkern der Tumorzelle vervielfacht ist, dann erscheinen mehr als zwei fluoreszierende Punkte, wenn die betreffende DNA-Region eine Lücke aufweist, erscheint kein Punkt oder nur ein Punkt. Allerdings zeigen ganz normale diploide Zellen auch oft weniger als zwei Punkte, weil die Sonden außerhalb der Schnittebene liegen oder sich überlappen. Die Anzahl der Punkte kann von einer Person oder auch mittels eines PC-Programms ausgezählt werden. Das Ergebnis besteht entweder aus einer Prozentzahl, welche die Zellkernanzahl angibt, die mehr als zwei Kopien eines bestimmten Locus besitzen, oder es gibt die Prozentzahl von Zellen an, die eine Zunahme oder einen Verlust von Signalen zeigen, im Vergleich zu einer Sonde, die gegen die zentromere Region eines Chromosoms gerichtet ist. Nachteile dieser Methode sind, dass bei unbemerkten

technischen Probleme, z.B. bei der Hybridisation, falsch positive Ergebnisse auftreten können. Auch ist bekannt, dass Tumorzellen des Spitz Nävus eine Tetraploidie aufweisen, die nicht mit einer chromosomalen Abweichung von Melanomzellen verwechselt werden darf (GERAMI und ZEMBOWICZ 2011). Ein weiterer Nachteil ist die manuelle Zählung der fluoreszierende Punkte, die aufwändig ist und sich als zum Teil schwierig erweist, wenn die Zellkerne klein sind (MOREY et al 2009). Vorteile der FISH sind die relativ einfache Methode im Gegensatz zur CGH und die kurze Dauer von ca. zwei Tagen.

#### 2.6.6 Elektronenmikroskopie

Die Morphologie der unterschiedlichen Melanosomenstadien wurde bereits im Punkt 2.2.1 beschrieben. Einige elektronendichte Strukturen können als Melanosomen fehlgedeutet werden. Die häufigste Fehlinterpretation ist ein Myelinkörperchen. Dieses Gebilde stellt im Allgemeinen ein Artefakt dar und besteht aus Schichten von pleomorphen, konzentrischen, elektronendichten Phospholipid- oder Lipoproteinmembranen. Weitere Verwechslungsmöglichkeiten sind multivesikuläre Körper, Phagosomen und Restkörperchen (ERLANDSON 1987). Außerdem können auch nicht melanozytäre Tumorzellen, die v.a. von der Neuralleiste abstammen, in seltenen Fällen Melaninpigment produzieren, wie z.B. Schwannzellen, oder bestimmte neuroendokrine Zellen (GHADIALLY 1985 S. 107). Auch phagozytiertes Melanin in Keratinozyten oder Melanophagen kann vorkommen. Allerdings handelt es sich bei phagozytiertem Melanin häufig um compound Melanosomen, die elektronenmikroskopisch von Melanosomen zu unterscheiden sind. Compound Melanosomen bestehen aus einer unterschiedlichen Anzahl von Melanosomen, die von einer einzelnen Membran umschlossen werden (ERLANDSON 1987). Außerdem besitzen Tumore, die von Keratinozyten ausgehen, Tonofilamente

und Desmosomen im Gegensatz zum Melanom (GHADIALLY 1985 S. 112). Um ein Melanom sicher mit dem Elektronenmikroskop diagnostizieren zu können, muss die Melaninsynthese innerhalb der Tumorzelle anhand von Prämelanosomen oder die Präsenz von abnormalen Melanosomen bewiesen werden (ERLANDSON 1987). Melanosomen sollen anhand ihrer typischen Streifung identifiziert werden. Der alleinige Nachweis von ovalen bis zigarettenförmigen elektronendichten Körpern ist nicht ausreichend für eine Diagnose (GHADIALLY 1985 S. 112). Obwohl Glutaraldehyd das Fixationsmittel der Wahl ist, gefolgt von Osmium zur Postfixation (GHADIALLY 1985 S. 5), ist bekannt, dass Melanosomen auch eine Fixation mit Formalin und die Paraffineinbettung überstehen (SMITH et al. 2002).

## 2.6.7 Immunhistochemie

### 2.6.7.1 Grundprinzip

Ziel der Immunhistochemie ist die Demonstrierung eines bestimmten Antigens auf einem Gewebeschnitt. Dies erfolgt durch die Bindung eines speziellen Antikörpers an das passende Antigen. Nach der Antigen-Antikörper Bindung wird diese durch eine farbige histochemische Reaktion für die Lichtmikroskopie sichtbar gemacht (RAMOS-VARA 2005).

#### 2.6.7.1.1 Antigene

Der größte Teil der Antigene sind Makromoleküle. Innerhalb dieser Makromoleküle existieren kurze Regionen, die Epitope genannt werden. Diese stellen die Bindungsstelle für den Antikörper dar. Die meisten Epitope sind Peptide und bestehen aus kurzen Aminosäuresequenzen (MIGHELL et al. 1998). Antigene haben zwei charakteristische Eigenschaften. Zum einen sind sie immunogen, d.h. dass sie die Fähigkeit besitzen, eine Antikörperbildung zu

induzieren. Zum anderen zeichnet sie eine spezifische Reaktivität aus. Das bedeutet, dass ein Antigen, das die Bildung eines bestimmten Antikörpers verursacht, auch mit diesem speziellen Antikörper reagiert (BOURNE 1983 S. 7).

#### 2.6.7.1.2 Antikörper

Als Antikörper werden vor allem Immunglobuline der Klasse IgG benutzt. Ein Antikörper besteht aus zwei identischen leichten und schweren Ketten (RAMOS-VARA 2005). Als leichte Ketten kommen zwei Varianten vor, nämlich  $\kappa$  oder  $\lambda$ . Die schweren Ketten bestimmen die Antikörperklasse und sind im Falle von IgG vom  $\gamma$  Typ (JUNGI 2000 S. 25). Die Fab-Region (**f**ragment **a**ntigen-**b**inding) stellt den Antigen-bindenden Anteil des Antikörpers dar. Der Fc-Teil (**f**ragment **c**rystallizable oder **c**omplement-binding) bestimmt die biologische Funktion des Antikörpers und erlaubt dem Antikörper, andere Antikörper zu binden (RAMOS-VARA 2005).

Außerdem unterscheidet man zwischen polyklonalen und monoklonalen Antikörpern. Die Produktion von monoklonalen Antikörpern geht auf KÖHLER und MILSTEIN zurück (KÖHLER und MILSTEIN 1976). Mäuse werden mit einem gereinigten Antigen infiziert. Nach der Immunantwort wird die Maus getötet und die B-Lymphozyten aus der Milz entnommen. Die Lebensdauer eines B-Lymphozyten ist begrenzt, deshalb werden diese mit Myelomzellen fusioniert. Anschließend wird die Hybridomzelle mit der gewünschten Eigenschaft selektiert. Die Hybridomzelle ist eine unsterbliche Zelle, die ein Immunglobulin spezifisch für ein bestimmtes Epitop produziert. Die Zellen können in Zellkultur gehalten werden. Dort ist die Antikörperproduktion eher gering, dafür aber sehr rein. Eine andere Möglichkeit ist, die Hybridomzelle intraperitoneal in eine Maus zu übertragen. In der Aszitesflüssigkeit sind höhere Mengen von dem selektierten Antikörper enthalten. Allerdings können hier nicht-spezifische Pro-

teine und Immunglobuline von der Maus vorkommen (RAMOS-VARA 2005). Polyklonale Antikörper werden von unterschiedlichen Plasmazellen produziert. Sie reagieren mit zahlreichen Epitopen eines Antigens (VAN HECKE 2002). Gereinigte polyklonale Antikörper haben den Vorteil gegenüber monoklonalen Antikörpern, dass sie mehrere Isoformen des Zielproteins identifizieren können (MIGHELL et al. 1998). Auch besitzen sie eine weite Reaktivität und höhere Affinität. Aber die Spezifität ist im Vergleich zu monoklonalen Antikörper geringer. Auch das Verhalten von polyklonalen Antiseren kann unterschiedlich ausfallen, da die Präsenz von Antikörpern, die gegen schwache und starke immunogene Epitope gerichtet sind, in derselben Präparation unterschiedlich ausfallen kann (RAMOS-VARA 2005).

#### 2.6.7.1.3 Antikörper-Antigen Bindung

Das wichtigste Kriterium für die Antikörper-Antigen Bindung ist die Tertiärstruktur des Epitopes. Der Antigen-bindende Teil des Antikörpers interagiert mit der Tertiärstruktur des Epitopes durch eine Reihe von nichtkovalenten Bindungen. Es handelt sich hierbei um schwache Bindungen, nämlich Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte und ionische Interaktionen.

Die Fixation mit Formaldehyd soll die zellulären Komponenten bewahren, einschließlich löslicher und struktureller Proteine. Auch beugt sie der Autolyse vor und vermeidet eine Deplazierung von zellulären Bestandteilen, einschließlich der Antigene und der Enzyme. Zusätzlich ermöglicht sie erst bestimmte Färbungen in der Histologie und der Immunhistochemie. Der Goldstandard der Fixierung ist das Formaldehyd. Es erhält hauptsächlich Peptide und die allgemeine Struktur der Organellen und interagiert auch mit Nukleinsäuren, aber nur wenig mit Kohlenhydraten. Der zugrundeliegende Mechanismus der Formaldehydfixation ist die Formation von zusätzlichen Produkten zwischen

dem Formalin und den ungeladenen reaktiven Aminogruppen (NH und NH<sub>2</sub>) (RAMOS-VARA 2005). Dabei werden Vernetzungen gebildet. Das Endergebnis einer Formaldehydfixation ist eine tiefe Veränderung in der Konformation der Makromoleküle, die die Erkennung des Antigens durch den Antikörper erschwert. Die Demaskierung des Antigens hat zum Ziel, das Epitop dem Antikörper wieder zugänglich zu machen. Die zwei am meisten verwendeten Methoden sind die enzymatische Demaskierung mit Proteasen (u.a. Trypsin, Pronase, Pepsin) und die auf Hitze basierende Demaskierung (CHEN et al. 2010). In einer veterinärmedizinischen Studie wurden 63 Antikörper in Hinsicht auf die optimale immunhistochemische Methode untersucht. 84% der Antikörper erforderten irgendeine Art der Antigen Demaskierung, um ein optimales Ergebnis zu erzielen (RAMOS-VARA und BEISSENHERZ 2000a).

#### 2.6.7.2 Detektionssysteme

##### 2.6.7.2.1 Direktes Detektionssystem

Die immunhistologischen Detektionssysteme können in direkte und indirekte Methoden und Mehrschrittverfahren unterteilt werden. Die direkte Methode beinhaltet einen Arbeitsschritt. Ein primärer Antikörper, der mit einem Indikatormolekül gekoppelt ist, reagiert mit dem Antigen (RAMOS-VARA 2005, VAN HECKE 2002). Es handelt sich hier um eine einfache und schnelle Technik mit hoher Spezifität. Allerdings ist die Sensitivität gering (RAMOS-VARA 2005). Ein weiterer Nachteil ist, dass für jedes Antigen ein separater konjugierter Antikörper benötigt wird. Wenn der entsprechende Antikörper nicht kommerziell erhältlich ist, muss die Konjugation entweder selbst vorgenommen werden oder es muss auf eine andere Methode zurückgegriffen werden (BOURNE 1983 S. 11).

#### 2.6.7.2.2 Indirektes Detektionssystem

Die indirekte Methode beinhaltet zwei Reagenzien. Der unmarkierte Primärantikörper reagiert mit dem Antigen. An diesen bindet der, mit einem Indikatormolekül versehene, Sekundärantikörper. Vorteil ist die höhere Sensitivität im Vergleich zur direkten Methode. Das beruht darauf, dass der Primärantikörper, zwei Sekundärantikörper binden kann. Die Anzahl der Indikatormoleküle pro Antigen ist somit bei der indirekten Methode höher als bei der direkten und damit verstärkt sich auch die Intensität der Reaktion. Mit dieser Methode können auch geringere Mengen an Antigen sichtbar gemacht werden. Die Durchführung der Methode benötigt allerdings länger als die der direkte Methode (RAMOS-VARA 2005).

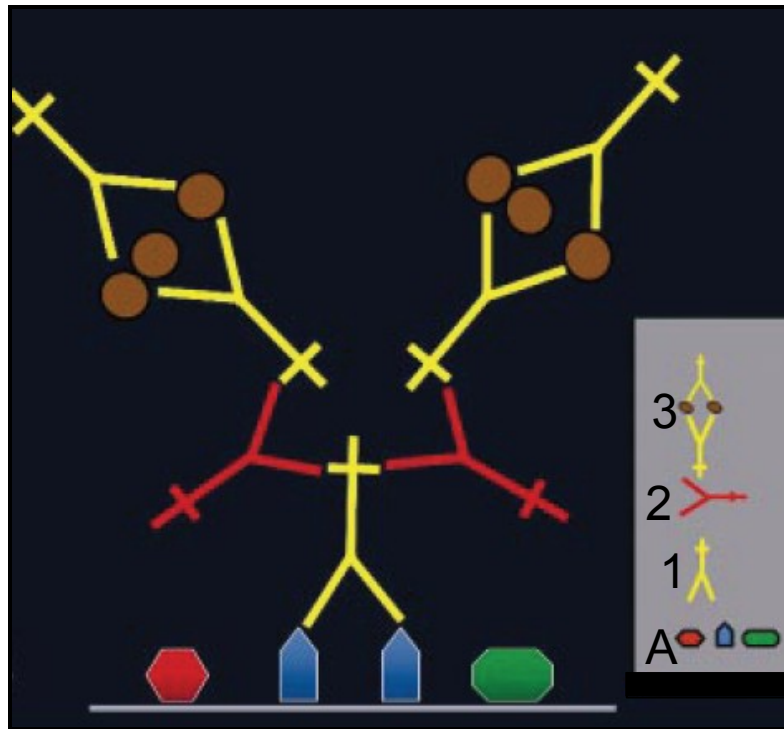
#### 2.6.7.2.3 Mehrschrittverfahren

Die löslichen Enzym-Immunkomplex Methoden und die Avidin-Biotin Methoden zählen zu den Mehrschrittverfahren (BOENISCH 1989b S. 24 und 25).

##### 2.6.7.2.3.1 Lösliche Enzym-Immunkomplex Methoden

Die Peroxidase-anti-Peroxidase (PAP) Methode und die alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase (APAAP) Methode zählen zu den löslichen Enzym-Immunkomplex Methoden (BOENISCH 1989b S. 24). Für die Peroxidase-anti-Peroxidase Methode und die alkalische Phosphatase-anti-alkalische Phosphatase Methode werden drei Reagenzien benötigt (s. Abb. 14). Im ersten Arbeitsschritt bindet der Primärantikörper an das Antigen. Als nächstes bindet der Sekundärantikörper, oder auch Brückenantikörper genannt, an den Primäranti-

körper. Das letzte Reagenz besteht aus dem Enzym (Peroxidase oder alkalische Phosphatase) und einem anti-Enzymkomplex, der gegen das jeweilige Enzym gerichtet ist (RAMOS-VARA 2005, VAN HECKE 2002).



**Abb. 14:** Schematische Darstellung der Peroxidase-anti-Peroxidase Methode. Der Primärantikörper (1) bindet an das Antigen (A). Der Brückenantikörper (2) bindet an den Primärantikörper. Der Peroxidase anti-Peroxidase Komplex (3) bindet an den Brückenantikörper (RAMOS-VARA 2005).

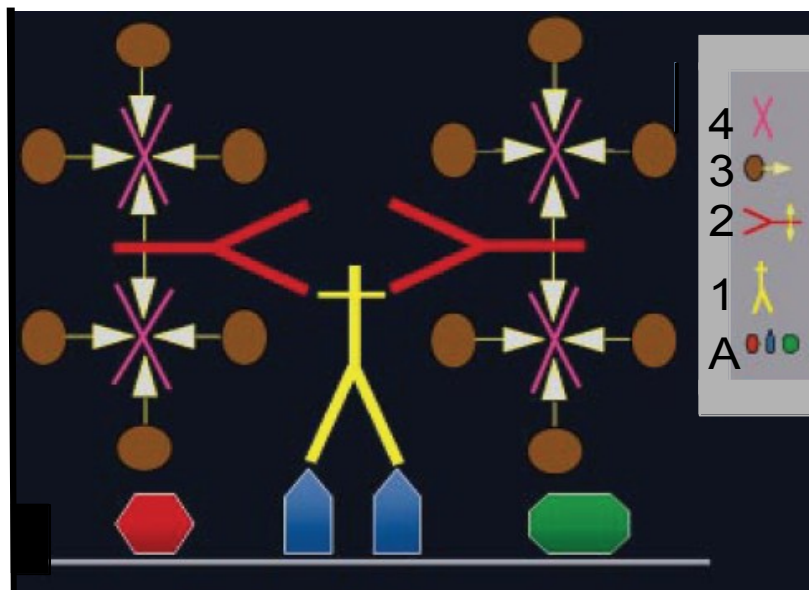
Der Primärantikörper und der Enzym anti-Enzym Komplex müssen aus derselben Tierart stammen, um durch den Brückenantikörper gebunden werden zu können. Außerdem ist es notwendig, den Brückenantikörper im Überschuss zuzugeben, damit eine Fab-Region des Sekundärantikörpers den Primärantikör-



per binden kann und die zweite Fab-Region an den Enzym anti-Enzym Komplex (RAMOS-VARA 2005, VAN HECKE 2002). Die Enzym-Immunkomplex-Methoden besitzen eine höhere Sensitivität als die indirekte Methode. Das beruht auf einer größeren Anzahl von Enzymmolekülen, die pro Antigen zur Verfügung stehen (BOENISCH 1989 S. 24).

#### 2.6.7.2.3.2 Avidin-Biotin Methoden

Die zwei am häufigsten verwendeten Systeme, die auf Avidin-Biotin beruhen sind die Avidin-Biotin-Komplex (ABC-) Methode und die Streptavidin-Biotin Methode (VAN HECKE 2002). Avidin ist ein Glykoprotein, welches aus dem Eiweiß gewonnen wird.



**Abb. 15:** Schematische Darstellung der Avidin-Biotin Methode. Der Primärantikörper (1) bindet an das Antigen (A). Der mit Biotin (dargestellt durch einen weißen Pfeil) konjugierte Sekundärantikörper (2) bindet an den Primärantikörper. Das dritte Reagenz besteht aus Avidin (4), welches mit drei Molekülen Biotin konjugiert ist. Biotin ist wiederum mit Peroxidase (braun) konjugiert (3). Der mit Peroxidase konjugierte Avidin-Biotin Komplex bindet an das konjugierte Biotin des Sekundärantikörpers (RAMOS-VARA 2005).

Es hat pro Molekül vier Bindungsstellen für Biotin, welches mit hoher Affinität gebunden wird. Biotin ist ein Vitamin, mit einer Bindungsstelle für Avidin und andere Bindungsstellen für Antikörper oder Makromoleküle wie z.B. Enzyme oder andere Indikatormoleküle (RAMOS-VARA 2005). Als erstes bindet wieder der Primärantikörper an das Antigen. Dann erfolgt die Bindung des Sekundärantikörpers, der mit Biotin konjugiert ist, an den Primärantikörper. Anschließend wird ein Peroxidase-konjugierter Avidin-Biotin-Komplex dazugegeben. Die freien Stellen des Avidinmoleküls binden an das Biotin des Sekundärantikörpers (s. Abb. 15). Als Indikatormolekül wird das Enzym Peroxidase verwendet. Mittels eines geeigneten Chromogens wird sie sichtbar gemacht (RAMOS-VARA 2005, VAN HECKE 2002, BOURNE 1983 S. 12). Der Nachteil dieser Methode ist, dass es durch unspezifische Bindungen von Avidin an Lektine und auch durch unspezifische elektrostatische Bindungen zur Hintergrundfärbung kommen kann. Dieser Hintergrund kann reduziert werden, wenn statt Avidin Streptavidin benutzt wird. Streptavidin wird durch das Bakterium *Streptomyces avidinii* produziert. Es hat eine geringere elektrostatische Interaktion mit Gewebeelementen und bindet auch kein Lektin (RAMOS-VARA 2005). Die hohe Affinität von Avidin bzw. Streptavidin gegenüber dem Biotin erhöht die Sensitivität der Avidin-Biotin Methode im Vergleich zur indirekten Methode (BOENISCH 1989 S.24).

#### 2.6.7.3 Indikatormoleküle und Chromogene

Um die Antigen-Antikörper Reaktion unter dem Lichtmikroskop sichtbar zu machen, muss, abhängig von der gewählten Methode, der primäre oder sekundäre Antikörper oder das tertiäre Nachweisreagenz mit einem Indikatormolekül gekoppelt werden. Für diesen Zweck existieren fluoreszierende Komponenten, Enzyme oder Metalle.

Enzymatische Indikatormoleküle werden am häufigsten verwendet (RAMOS-VARA 2005). Darunter zählt auch die Meerrettichperoxidase. Das Enzym wird aus der Wurzel des Meerrettichs gewonnen. Es besitzt eine eisenhaltige Hämgruppe (Hämatin) als Aktivitätszentrum, welche zuerst einen Komplex mit Wasserstoffperoxid bildet, der anschließend unter Abspaltung von Wasser und atomarem Sauerstoff zerfällt. Die Visualisierung der Peroxidase erfolgt meistens durch das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB). Es agiert als Elektronendonator. Durch die Elektronenabgabe wandelt sich DAB in ein braun gefärbtes Reaktionsprodukt um, das in Alkohol und anderen organischen Lösungsmitteln unlöslich ist (BOENISCH 1989a S. 18, 19).

#### 2.6.7.4 Gegenfärbung

Die Wahl der Gegenfärbung hängt hauptsächlich von der Farbe der Immunreaktion ab. Die Gegenfärbung muss genug Kontrast geben, um Verwechslungen mit dem Chromogen-Präzipitat auszuschließen. Es wird meistens Hämatoxylin verwendet (RAMOS-VARA 2005).

#### 2.6.7.5 Probleme der Immunhistochemie

##### 2.6.7.5.1 Hintergrundfärbung

Das häufigste Problem der Immunhistochemie ist die Hintergrundfärbung. Sie entsteht sowohl durch hydrophobe Interaktionen von Proteinen als auch ionische und elektrostatische Interaktionen. Die hydrophobe Eigenschaft der Proteine nimmt während der Fixation zu, deshalb sollten verlängerte Fixationszeiten in Formalin vermieden werden. Immunglobuline sind ebenfalls sehr hydrophobe Moleküle. Aggregation und Polymerisation führen zu einer Zunahme der hydrophoben Eigenschaft, die beobachtet wird, wenn Immunglobuline gelagert werden (RAMOS-VARA 2005). Eine weitere Methode, um unspezifische Hin-

tergrundreaktionen zu reduzieren ist das Hinzufügen einer neutralen Proteinlösung bevor der Primärantikörper aufgetragen wird. Dieses Protein lagert sich an die elektrisch geladenen Stellen im Gewebeschnitt, wie z.B. an Kollagen oder an andere Bindegewebelemente an und verhindert somit eine unspezifische Anlagerung von Antikörper an diesen Lokalisationen. Klassischerweise benutzt man dazu ein Non-Immunserum derselben Tierspezies, aus der der Brückenantikörper stammt (BOURNE 1983 S. 13).

#### 2.6.7.5.2 Kreuzreaktionen

Monoklonale Antikörper sind gegen bestimmte Epitope gerichtet, die aus wenigen Aminosäuren ( $n = 8-10$ ) bestehen. Diese Aminosäuresequenz kann auch bei anderen Proteinen vorkommen. Wenn der Antikörper an ein solches „falsches“ Epitop bindet, sind die Färbeeigenschaften fast identisch mit denen des „richtigen“ Epitopes und somit nur schwer zu unterscheiden.

#### 2.6.7.5.3 Endogene Peroxidaseaktivität

Bei der Substrat-Chromogenreaktion ist keine Unterscheidung möglich, ob es sich bei dem nachgewiesenen Enzym um das Enzym handelt, das durch die Immunreaktion das zelluläre Antigen lokalisiert, oder ob es sich um die endogene Peroxidaseaktivität handelt, die schon vor Beginn der Anfärbung im Präparat vorhanden war. Es ist deshalb notwendig, die endogene Peroxidase vor der Immunreaktion irreversibel zu hemmen. Dies kann dadurch geschehen, dass man die Gewebeschnitte 20 Minuten in ein Bad aus Methanol und 3%  $H_2O_2$  stellt (BOURNE 1983 S. 13). Die endogene Peroxidase wird durch den Substratüberschuß gehemmt. Der Komplex aus Peroxidase und einem Überschuss an Wasserstoffperoxid ist katalytisch inaktiv und bei Fehlen eines Elektronendonators blockiert (BOENISCH 1989a S. 18).

## 2.6.8 Immunhistochemie am menschlichen Melanom

Antikörper gegen menschliche melanozytäre Tumorzellen können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe bezeichnet die melanozytären Differenzierungsmarker und die zweite Gruppe beinhaltet die Melanom-Progressionsmarker (OHSIE et al. 2008, DE WIT et al. 2004).

### 2.6.8.1 Erste Gruppe: melanozytäre Differenzierungsmarker

Diese Antikörper sind spezifisch für die melanozytäre Zelllinie. Aufgrund dessen können diese Marker benutzt werden, um wenig differenzierte Melanome von anderen nicht melanozytären Tumoren zu unterscheiden. Ein idealer Antikörper dieser Gruppe vereint hohe Sensitivität und hohe Spezifität (DE WIT et al. 2004).

#### 2.6.8.1.1 S100-Proteinfamilie

Das erste Mitglied der S100-Proteinfamilie wurde 1965 von Moore identifiziert. Es wurde vom Rindergehirngewebe extrahiert. Benannt wurde es nach der charakteristischen Eigenschaft selbst in einer 100% gesättigten Ammoniumsulfatlösung bei neutralem pH-Wert gelöst zu bleiben. Die Beschreibung „soluble in 100% saturated ammonium sulfate“ wurde abgekürzt zu S100 (MCNUTT 1998). Mittlerweile wurden insgesamt 21 Vertreter der S100-Proteine identifiziert (DONATO 2003) und das von Moore benannte Protein S100 wurde umbenannt in S100B (SALAMA et al. 2008). Biochemisch stellen die Proteine eine Gruppe mit einem niedrigen Molekulargewicht dar, die durch zwei  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen charakterisiert ist. Sie haben die Fähigkeit, Monodimere, Heterodimere und Oligomere zu bilden (SALAMA et al. 2008). Eine Ausnahme stellt Calbindin dar, das strukturell ein Monomer ist (DONATO

2003). Die Schlüsselstrukturen der S100-Proteinfamilie ähneln sich, obwohl die Proteinsequenz der verschiedenen Mitglieder variieren kann. Jedes S100-Polypeptid beinhaltet zwei Kalzium-Bindungsdomänen, die durch die sogenannte hinge-Region verbunden ist. Jedes Dimer bindet insgesamt vier Kalziumionen. Die Bindung verursacht eine Konformationsänderung, und es öffnet sich eine weite hydrophobe Spalte, die die Interaktionsstelle des S100-Proteins mit dem Zielprotein darstellt (MARENHOLZ et al. 2004, ZIMMER et al. 2003). Aber die Bindung an ein Zielproteine kann bei manchen S100-Proteinen auch Kalzium unabhängig sein (ZIMMER et al. 2003). Die Funktionen von S100-Proteinen sind vielfältig. Intrazelluläre Aufgaben sind Regulation der Proteinphosphorylierung, Mitwirkung in der Dynamik des Zytoskelettes, in der Kalziumhomöostase, in den Enzymaktivitäten und den Transkriptionsfaktoren, beim Zellwachstum und der Zelldifferenzierung und bei der Entzündungsantwort (DONATO 2003). Extrazelluläre Rollen für einige S100-Proteine wurden ebenfalls nachgewiesen. Manche der S100-Proteine wirken als chemischer Lockstoff für Leukozyten, Aktivatoren der Makrophagen und Modulatoren der Zellproliferation (SALAMA et al. 2008). S100-Proteine interagieren im Zellkern auch mit p53, haben jedoch einen unterschiedlichen Einfluss darauf (SALAMA et al. 2008, DONATO 2003). Diese Funktionen assoziieren S100 mit einer Reihe von pathologischen Geschehnissen, wie Entzündungsreaktionen, Kardiomyopathien und allmählich wird auch die Rolle von S100 bei der Kanzerogenese deutlich (SALAMA et al. 2008). Die polyklonalen Formen des Antikörper gegen S100 stellen den goldenen Standard für die Routinediagnose eines Melanoms dar (ORCHARD 2000). Die Sensitivität liegt bei 97-100% (OHSIE et al. 2008), weil das S100-Protein in fast allen primären und metastatischen malignen Melanomen und benignen Nävi vorkommt (ZUBOVITS et al. 2004). Unglücklicherweise ist die Spezifität dieses Markers jedoch stark begrenzt (OHSIE et al. 2008, ZUBOVITS et al.

2004, ORCHARD 2000). S100-Proteine lassen sich im neuralem Gewebe und auch in Geweben nachweisen, die von der Neuralleiste abstammen. Außerdem findet man es in Chondrozyten, Adipozyten, myoepithelialen Zellen, Langerhans-Zellen und T-Lymphozyten (MCNUTT 1998, COCHRAN und WEN 1985). Eine Vielzahl anderer Tumore exprimiert S100-Proteine. Darunter fallen u.a. Tumore des zentralen und peripheren Nervensystems (Glioblastom, Schwannom, Granularzelltumor, Paragangliom, Ganglioneurom, Neuroblastom, gemischter Nervenscheidentumor), pigmentierte Läsionen der Haut (Melanom, zahlreiche Nävitypen), mesenchymale Tumore (Liposarkom, Retikulo-histiozytom, Retikuloendothelium), epitheliale Tumore (Mammakarzinom) und gemischte Tumore (Chordom, Myoepitheliom) (SCHMITT und BACCHI 1989). Die Spezifität beträgt ca. 75-87% (OHSIE et al. 2008). Trotz der geringen Spezifität werden in der Melanomdiagnostik Antikörper gegen S100-Proteine meist in Kombination mit anderen Antikörpern benutzt (DE WIT et al. 2004). Die Immunreaktion lässt sich im Nukleus und im Zytoplasma beobachten (COCHRAN und WEN 1985).

#### 2.6.8.1.2 HMB45

Das Silver locus Gen wurde in Folge der Erforschung der „silver mutation“ entdeckt. Dieses Gen kodiert ein Polypeptid, welches in unterschiedlichem Zusammenhang noch öfter durch andere Arbeitsgruppen unter einem anderen Namen beschrieben wurde. So ist dieses Protein als PMEL17, gp100, gp95, gp85, ME20, RPE1, SILV und MMP115 bekannt. Das menschliche gp100 stellt ein Melanom assoziiertes Antigen dar. Mehrere Forschungsgruppen haben unabhängig voneinander Antikörper gegen gp100 entwickelt. Diese Antikörper sind u.a.: NKI-beteb, HMB45, HMB50, ME20 (THEOS et al. 2005),  $\alpha$ PEP13h und  $\alpha$ mSin (YASUMOTO et al. 2004). HMB45 wurde als erstes von Gown und Mitarbeitern beschrieben. In dieser Arbeit zeigte der Antikörper eine

Sensitivität von 97% und eine Spezifität von fast 100%. In 168 getesteten Tumoren unterschiedlicher Abstammung, konnten nur in vier Fällen wenige HMB45 positive Tumorzellen nachgewiesen werden. Die restlichen Proben zeigten eine gute Reaktivität. Der Antikörper zeigt eine zytoplasmatische Reaktion und reagiert nicht mit normalen epidermalen Melanozyten. Außerdem zeigt HMB45 manchmal eine positive Reaktion, die auf eine bestimmte Lokalisation des Tumors beschränkt bleibt, d.h. nicht den ganzen Tumor betrifft (GOWN et al. 1986). In weiteren Studien wurde über eine Sensitivität von 50-100% berichtet (YAZIJI und GOWN 2003). Die 100%ige Spezifität berichtet von GOWN und Mitarbeiter und WICK und Mitarbeitern wurde leider widerlegt (WICK et al. 1988, GOWN et al. 1986). HMB45 zeigt auch eine positive Reaktion mit Plattenepithelkarzinomen, Tumoren der Schweißdrüse, meningealen Melanozytomen, klarzelligen Sarkomen der Sehnen und Aponeurosen, einigen ovariellen Steroidzelltumoren, einigen Mammatumoren und Nierenzellkarzinomen (OHSIE et al. 2008). Die Funktion von gp100 wurde in Punkt 2.2.1 beschrieben. HMB45 reagiert im Melanosom mit einem heterogenen Fragment von gp100 mit einem niedrigen Molekulargewicht. Die geschätzte Größe beträgt ca. 34-38 kDa. Die Reaktivität geht verloren, wenn sich Melanin an die fibrilläre Matrix anheftet. Eine Reaktion ist deshalb nur in Melanosomenstadien I und II zu sehen, während das Stadium III und IV keine Reaktivität mehr zeigt (YASUMOTO et al. 2004). Der Verlust der Reaktivität kann entweder durch den Verlust des Antigens in späteren Melanosomenstadien erklärt werden oder durch eine Maskierung des Antigens durch das Melanin (SCHAUMBURG-LEVER et al. 1991). Die anderen Antikörper, die gegen gp100 gerichtet sind, erkennen andere Domänen dieses Polypeptides (YASUMOTO et al. 2004).



### 2.6.8.1.3 MelanA/MART-1

Im Zuge der Forschung für die Immuntherapie haben KAWAKAMI und Mitarbeiter ein bis dahin unbekanntes Gen isoliert, das ein menschliches Melanom-Antigen kodiert, welches von Tumor-infiltrierenden Lymphozyten erkannt wird. Dieses Antigen wurde MART-1 (melanoma antigen recognized by T cells 1) genannt. Es ist ein transmembranes Protein, bestehend aus 118 Aminosäuren. Die Expression dieses Antigens beschränkt sich auf Melanome, melanozytäre Zelllinien und menschliche Retina (KAWAKAMI et al. 1994). Zeitgleich und unabhängig von dieser Arbeitsgruppe wurde ein Gen entdeckt, welches ein Melanom-Antigen kodiert, das von autologen zytotoxischen T-Zellen erkannt wird. Dieses Gen wurde MelanA genannt. Es ist 18kb lang, besteht aus 5 Exons und wird in Melanomen und im Melanozyten exprimiert (COULIE et al. 1994). Beide Forschungsgruppen haben also unabhängig voneinander dasselbe Gen und dasselbe Antigen entdeckt.

Chen und Mitarbeiter haben gegen das rekombinante MelanA-Protein den monoklonalen Antikörper A103 entwickelt, bekannt auch unter dem Namen MelanA (CHEN et al. 1996). Ein Jahr später entwickelten Fetsch und Mitarbeiter einen monoklonalen Antikörper gegen das MART-1-Antigen, bekannt unter dem Namen M2-7C10 oder MART-1 (FETSCH et al. 1997).

Eine fast 100%ige Übereinstimmung beider Antikörper wurde im Reaktionsverhalten bei Melanomen gefunden. Die Sensitivität beider Antikörper liegt bei 75-92% und die Spezifität bei 95-100% (OHSIE et al. 2008). Allerdings gibt es einen Unterschied im Reaktionsverhalten beider Antikörper. A103 ist in der Lage, mit steroidproduzierenden Tumoren (adrenokortikales Adenom, adrenokortikales Karzinom, Leydigzelltumore des Testis, Sertoli-Leydigzelltumore des Ovars) zu reagieren, während M2-7C10 keine Reaktion in diesen Neoplasien zeigt. Gründe hierfür können unterschiedliche Epitope desselben

Antigens sein, welche von den Antikörper erkannt werden, oder auch Unterschiede in der immunhistochemischen Methode. Die Reaktion in adrenokortikalen und anderen Steroidhormon-produzierenden Zellen beruht aber wahrscheinlich auf einer immunhistochemischen Kreuzreaktion, da keine MelanA-mRNA im normalen Nierengewebe gefunden wurde (BUSAM et al. 1998). Die Funktion von MART-1 ist noch nicht genau geklärt. Allerdings ist bekannt, dass MART-1 im endoplasmatischen Retikulum und/oder im frühen Golgi-Apparat, einen Komplex mit gp100 bildet und die Expression, Stabilität, den Transport und die Verarbeitung von gp100 beeinflusst. MART-1 ist für die gp100 Funktion unerlässlich und spielt deshalb eine wichtige Rolle in der Pigmentation (HOASHI et al. 2005).

#### 2.6.8.1.4 Anti-Tyrosinase

Tyrosinase stellt ein zytoplasmatisches melanozytäres Differenzierungsprotein dar und ist ein Schlüsselenzym der Melaninsynthese (ORCHARD 2000). Tyrosinase hydroxyliert Tyrosin im ersten Reaktionsschritt der Melaninsynthese (SLOMONSKI et al. 2004). Eine positive Reaktion äußert sich in einer feinen granulären zytoplasmatischen Färbung (HOFBAUER et al. 1998). Gegen das Protein Tyrosinase wurden zwei monoklonale Antikörper entwickelt, T311 und MAT-1 (WICK und PATTERSON 2003). Die Sensitivität von T311 liegt bei 79-93% (BUSAM 2005, JUNGBLUTH et al. 2000, ORCHARD 2000, HOFBAUER et al. 1998) und ist abhängig vom klinischen Stadium. Spätere Melanomstadien zeigen eine bessere Reaktion als frühere Stadien (HOFBAUER et al. 1998). Desmoplastische Melanome zeigen eine geringere Sensitivität als andere Melanomtypen (ORCHARD 2000). Die Spezifität liegt bei 97-100% (MIETTINEN et al. 2001, JUNGBLUTH et al. 2000, BISHOP et al. 1993). Positive Reaktionen mit Tyrosinase wurden in renalen/retroperitonealen Angiolipomen, wenigen Angiomyolipomen, klarzelligen Sarkomen der

Sehnenscheide und Aponeurosen (MIETTINEN et al. 2001), dem pigmentierten Anteil von Schwannomen und dem pigmentierter Anteil von Neurofibromen gefunden (BOYLE et al. 2002).

#### 2.6.8.1.5 MITF

Das Microphthalmia-Gen kodiert ein einfaches Helix-Loop-Helix Zipperprotein. Dieser Microphthalmia Transkriptionsfaktor (MITF), reguliert die Transkription von Genen, die bei der Pigmentsynthese eine Rolle spielen, wie z.B. Tyrosinase. Außerdem ist er an der embryologischen Entwicklung und am postnatalen Überleben der Melanozyten beteiligt. Es wurden zwei Antikörper gegen den Transkriptionsfaktor entwickelt. C5 erkennt sowohl human-MITF als auch Mäuse-Mitf. D5 dagegen ist nur gegen humanes MITF gerichtet (BUSAM et al. 2001). Die Sensitivität liegt bei 81-100% (OHSIE et al. 2008). Die Spezifität ist gering. Positive Reaktionen wurden in folgenden Geweben beobachtet: epidermale und follikuläre Melanozyten, Makrophagen, Histozyten, follikuläre dendritische Zellen des Lymphknotens, Schwannzellen, stromale Fibroblasten an variablen Lokalisationen und glatte Muskelzellen. Fokale positive Reaktionen wurden u.a. im fibrösen Histiocytom, Dermatofibrosarkom, Leiomyosarkom und in den melanotischen Formen von Nervenscheidentumoren und im melanotischen Schwannom gesehen. Adenokarzinome des Pankreas, der Niere und des Ovars, Seminome, periphere T-Zell-Lymphome, solitäre fibröse Tumore, Schwannome, Neurofibrome, Fibrosarkome, Leiomyosarkome, Chondrome, Chondrosarkome und Osteosarkome zeigten auch eine Reaktion mit D5. Die meisten positiven Zellen zeigten eine nukleäre Reaktion, außer glatte Muskelzellen, Makrophagen, und Histozyten, die eine nukleäre und zytoplasmatische Reaktion aufwiesen (BUSAM et al. 2001).

#### 2.6.8.1.6 NKI/C3

Dieser Antikörper ist gegen melanozytäre Glykoproteine gerichtet, die sich an der inneren Membran von zytoplasmatischen Vesikeln befinden (FERNANDO et al. 1994). Eine positive Reaktion zeigt sich in einer peripheren Membranfärbung (FERNANDO et al. 1994). Die Sensitivität beträgt 86-100%. Jedoch ist die Spezifität äußerst gering. Neurothekome, medulläre Karzinome der Schilddrüse, Granularzelltumore und neuroendokrine Tumore, Karzinome (lokalisiert an Brust, Prostata, Lunge, kolorektal, Blase und an den Ovarien), Lymphome, Neurofibrome und Schwannome zeigen ebenfalls eine Reaktion (ZUBOVITS et al. 2004, ORCHARD 2000, ORCHARD und WILSON JONES 1994, VENNEGOOR et al. 1985, MACKIE et al. 1984). Auch über eine Reaktion in Histiozyten, dendritischen Zellen, endothelialen Zellen, Mastzellen, eosinophilen Granulozyten, Speicheldrüse, bronchialen Zellen, Schweißdrüse, Pankreas und in der Prostata ist berichtet worden (ZUBOVITS et al. 2004, ORCHARD 2000, YU et al. 1999, ORCHARD und WILSON JONES 1994, VENNEGOOR et al. 1985).

#### 2.6.8.1.7 MEL-1 (Klon R24)

Im Rahmen der Erforschung der Oberflächenantigenen von in Kultur lebenden Melanomzellen, entwickelten DIPPOLD und Mitarbeiter den monoklonalen Antikörper R24 (DIPPOLD et al. 1980). Als Antigen dient das Disialogangliosid D3 (PUKEL et al. 1982). Ganglioside sind komplexe Lipide mit einem starken amphiphilen Charakter. Die Lipidkomponente von Gangliosiden, die alle Sphingolipide teilen, wird Ceramid genannt und besteht aus einem langkettigen Aminoalkohol (Sphingosin). Dieser ist mit einer Aminobrücke mit einer Fettsäure verbunden. Die Oligosaccharidkette der Ganglioside ist variabel. Im Fall der Ganglioside ist die Zuckerkomponente die Sialinsäure. Sphingolipide, Glycerophospholipide und Cholesterol sind die Lipidkomponenten der Zell-

membran. Die Forschung ist noch nicht abgeschlossen, aber es wird angenommen, dass Ganglioside funktionelle Moleküle sind, die bei der Modulation der Enzymeigenschaften, in der Zellkommunikation, Zelladhäsion und der Proteinsortierung involviert sind (SONNINO et al. 2006). Der Antikörper weist eine hohe Sensitivität auf und zeigt positive Reaktionen in Melanomen (ZHANG et al. 1997, DIPPOLD et al. 1985), metastatischen Melanomen und z.T. auch in gewissen Nävitypen (DIPPOLD et al. 1985). Melanozytäre Tumorzellen zeigen hauptsächlich eine Oberflächenfärbung (DIPPOLD et al. 1985). Reaktionen im normalen Gewebe wurden im Gehirn und im Bindegewebe (Mamma, Prostata, Magen, Uterus, Ovar und Niere) gefunden (ZHANG et al. 1997). In einer weiteren Studie wurde eine schwache und irreguläre Reaktion in den spindelförmigen Zellen der Basalschicht der normalen humanen Epidermis gesehen. Ein kleiner Prozentsatz von Zellen in der Zona reticularis der Nebenniere reagierte ebenfalls positiv. Einzelne positive Zellen, mit granulärer zytoplasmatischer Färbung, traten im intestinalen Gewebe auf. Von 39 hauptsächlich epithelialen Tumoren reagierten nur zwei maligne Karzinoide des Pankreas und des Rektums positiv (DIPPOLD et al. 1985). Ein Nachteil ist, dass R24 nur am gefrorenen Gewebe eine Reaktion zeigt (ZHANG et al. 1997, DIPPOLD et al. 1985).

#### 2.6.8.1.8 PNL2

PNL2 bezeichnet einen monoklonalen Antikörper, der gegen ein neues melanozytäres Antigen gerichtet ist, welches sich wahrscheinlich von gp100 und MelanA unterscheidet. Im Versuch erzielte es in 46 Melanomen von insgesamt 49 Melanomen eine positive zytoplasmatische Reaktion. Melanozyten der Haut und der oralen Mukosa waren ebenfalls positiv. Alle intraepidermalen Nävi zeigten eine Reaktion. Allerdings reagierten intradermale Nävi und dermale Komponenten nicht mit dem Antikörper. Das klarzellige Sarkom, Angiomyoli-

pom und die Lymphangioliomyomatose zeigten eine positive Reaktion (ROCHAIX et al. 2003).

Dies stellt eine Auswahl der Antikörper der ersten Hauptgruppe dar.

#### 2.6.8.2 Zweite Hauptgruppe: Melanom Progressionsmarker

Mit Antikörpern aus dieser Gruppe kann die Malignität und/oder die Aggressivität der Tumorzellen festgestellt werden. Mit Hilfe dieser Antikörper soll eine Unterscheidung zwischen benignen Nävi und malignen Melanomen möglich sein. Tabelle 3 gibt eine Übersicht der Melanom Progressionsmarker.

**Tab. 3:** Übersicht über die Melanom Progressionsmarker

<b>Gruppe</b>	<b>Marker</b>
Wachstumsfaktoren und Rezeptoren der Wachstumsfaktoren	VEGF VEGFR-3 bFGF TGF-beta EGF/EGFR Osteonectin Transferrin receptor c-kit
Signalmoleküle	PTEN Akt/PKB
Transkriptionsfaktoren	ATF-1 AP-2 transcription factor
Proliferationsmoleküle	Ki67/MIB-1 PCNA Cyclin A, B, D1/D3, E CDK2 p16 <sup>INK4a</sup> P21 <sup>WAF1</sup> P27 <sup>kip1</sup> p53 HDM2 GADD
Adhäsionsmoleküle	$\alpha/\beta$ -catenin E-Cadherin N-Cadherin Integrins $\alpha_V$ , $\beta_3$ , $\alpha_5\beta_1$ ILK CD44 <sub>s</sub> ICAM MEL-CAM/MUC18 ALCAM VCAM-1 L1 (CD171) CD63 Fascin

Proteasen und mit Proteasen verwandte Moleküle	MMP-2 MMP-9 MT1-MMP EMMPRIN Plasminogen activation system Cathepsin B, D und L FAP
Andere Proteine	APAF-1 Metallothionein ACS/TMS1 Skeletrophin MTAP Versican h-CD/CNh1 SKI

(DE WIT et al. 2004)

Obwohl diese Tabelle eine Fülle an Markern suggeriert, hat sich kein Antikörper in der Routinediagnostik oder Prognostik durchgesetzt, da keiner einen signifikanten Vorteil für die Diagnostik oder Prognostik besitzt. Die einzige Ausnahme stellt Ki-67 dar, welcher gewöhnlich benutzt wird, um benigne Nävi von Melanomen zu unterscheiden (OHSIE et al. 2008).

Ki-67 gehört zu den Proliferationsmarkern. Es ist ein nukleäres Antigen, welches in der G<sub>1</sub>, M, G<sub>2</sub> und S Phase des Zellzyklus exprimiert wird. In der Ruhephase (G<sub>0</sub> Phase) kommt es nicht vor (MORETTI et al. 2001, HENRIQUE et al. 2000, TALVE et al. 1996, RIEGER et al. 1993). Ki-67 zeigt eine geringe Expression in benignen Läsionen, während in malignen Melanomen 13-30% der Zellen eine positive Reaktion aufweisen können (OHSIE et al. 2008, RIEGER et al. 1993).

#### 2.6.9 Immunhistochemie beim kaninen Melanom

Folgende Tabelle 4 enthält eine Übersicht der verwendeten Antikörper in der ka-



nen Melanomdiagnostik.

**Tab. 4:** Übersicht über die verwendeten Antikörper in der kaninen Melanomdiagnostik

<b>Antikörper</b>	<b>positive Anzahl der getesteten Melanome/Ge- samtzahl der getesteten Melanome</b>	<b>Autor</b>
<b>HMB45</b>	22/25	SULAIMON et al. 2002
<b>HMB45</b>	0/4	RUIZ et al. 2005
<b>HMB45</b>	6/49	SMEDLEY et al. 2011
<b>HMB45/50</b>	0/13	BERRINGTON et al. 1994
<b>HMB45/50</b>	0/5	RAMOS-VARA et al. 2000
<b>MEL-1</b>	18/25	SULAIMON et al. 2002
<b>NKI/C3</b>	0/7	SULAIMON et al. 2002
<b>NKI/C3</b>	0/13	BERRINGTON et al. 1994
<b>NKI/beteb</b>	0/13	BERRINGTON et al. 1994
<b>S100</b>	5/5	RUIZ et al. 2005
<b>S100</b>	26/31	SANDUSKY et al. 1985
<b>S100</b>	10/18	SANDUSKY et al. 1987
<b>S100</b>	98/129	RAMOS-VARA et al. 2000
<b>S100</b>	19/21	CHOI und KUSEWITT 2003
<b>S100</b>	6/7	CANGUL et al. 2001
<b>S100a</b>	23/29	KOENIG et al. 2001
<b>S100</b>	40/49	SMEDLEY et al. 2011
<b>MelanA</b>	118/129	RAMOS-VARA et al. 2000
<b>MelanA</b>	5/7	CANGUL et al. 2001
<b>MelanA/MART-1</b>	18/29	KOENIG et al. 2001
<b>MelanA</b>	40/49	SMEDLEY et al. 2011
<b>MelanA</b>	101/113	RAMOS-VARA und MILLER 2011
<b>Vimentin</b>	129/129	RAMOS-VARA et al. 2000
<b>Vimentin</b>	6/7	CANGUL et al. 2001
<b>Vimentin</b>	27/28	KOENIG et al. 2001
<b>NSE</b>	115/129	RAMOS-VARA et al. 2000
<b>NSE</b>	7/7	CANGUL et al. 2001
<b>NSE</b>	18/29	KOENIG et al. 2001
<b>TRP-1</b>	27/49	SMEDLEY et al. 2011

TRP-2	13/21	CHOI und KUSEWITT 2003
TRP-2	39/49	SMEDLEY et al. 2011
<b>Tyrosinase</b>	0/7	CANGUL et al. 2001
<b>Tyrosinase</b>	3/49	SMEDLEY et al. 2011
<b>Tyrosinase</b>	90/113	RAMOS-VARA und MILLER 2011
<b>Tyrosin-Hydroxylase</b>	3/49	SMEDLEY et al. 2011
PNL2	44/49	SMEDLEY et al. 2011
PNL2	106/113	RAMOS-VARA und MILLER 2011
<b>MiTF</b>	45/49	SMEDLEY et al. 2011
IBF9	24/38	OLIVER und WOLFE 1992
<b>Antikörper-Cocktail (PNL2, MelanA, TRP-1, TRP-2)</b>	46/49	SMEDLEY et al. 2011
Komination von HMSA-1 und HMSA-5	30/35	BERRINGTON et al. 1994

Da in dieser Dissertation mit den Antikörpern HMB45, MelanA und S100 gearbeitet wurde, wird nur auf diese Antikörper näher eingegangen.

#### 2.6.9.1 MelanA

MelanA zeigt in der oben aufgeführten Tabelle eine Sensitivität von 71,4 - 91,5%. Jeder der oben aufgeführten Autoren benutzte eine Methode zur Demaskierung des Antigens. Es wurde in den meisten Fällen eine Mikrowelle verwendet, entweder mit EDTA-Puffer oder Citratpuffer. Das immunhistochemische Protokoll beruht bei jedem der Autoren auf einer indirekten Methode (LSAB, ABC-Methode) (RAMOS-VARA und MILLER 2011, SMEDLEY et al. 2011, CANGUL et al. 2001, KOENIG et al. 2001, RAMOS-VARA et al. 2000). Positive Reaktionen im normalen Gewebe des Hundes kommen in folgenden Geweben vor: Epithel der interlobulären und intralobulären Kanälen der Speicheldrüse, intraepidermale Melanozyten der Haut und selten des Haarbulbus, Azinuszellen der Prostata, Urethraepithel, Epithelzellen des Augenlides, respiratorisches und alveoläres Epithel, Duktus-

epithel des Pankreas, Epithelzellen der Nebennierenrinde (v.a. Zona fasciculata und reticularis) und Leydigzellen des Testis. Von insgesamt 163 nicht melanozytären kaninen Tumoren wurden nur im Speicheldrüsenkarzinom und im Übergangsepithelkarzinom Kreuzreaktionen entdeckt. Die Reaktion in den Melanomzellen ist heterogen mit Bereichen, die überhaupt keine Reaktion zeigten und anderen Bezirken, die dagegen stark reagierten. MelanA färbt das Zytoplasma der Tumorzelle in drei Mustern: diffus, fokal oder beides. Die Reaktivität für MelanA ist unabhängig davon, ob die Tumorzellen oberflächlich oder in der Tiefe des Tumors liegen. RAMOS-VARA und Mitarbeiter beschreiben eine Reaktivität in allen Tumorzelltypen. Aber der Autor stellt fest, dass sich weniger Spindelzellen als polygonale Zellen färben lassen (RAMOS-VARA et al. 2000). RAMOS-VARA und Mitarbeiter berichteten über einen Verlust der Reaktivität von MelanA bei einer Dekalzifizierung des Präparates mit Salzsäure (RAMOS-VARA und MILLER 2011).

#### 2.6.9.2 S100

S100 hat eine Sensitivität gemäß der oben genannten Tabelle von 76-100%. Allerdings ist die Spezifität sehr gering. SMEDLEY und Mitarbeiter berichteten von einer Spezifität von 20%, da von insgesamt 10 spindelzelligen Weichteilsarkomen als Negativkontrolle, acht eine positive Reaktion zeigten (SMEDLEY et al. 2011). Kreuzreaktionen finden sich in folgenden kaninen nicht melanozytären Tumoren: Leiomyosarkome, Fibrosarkome und Schwannome (CHOI und KUSEWITT 2003). Auch normales Gewebe vom Hund zeigt positive Reaktionen mit S100: Melanozyten, Schweißdrüsen der Haut, myoepitheliale Zellen der Mamma, Chondrozyten der Trachea, Sternzellen der Hypophyse, Retikulumzellen des Lymphknotens und in den Peyerschen Platten des Ileums (SANDUSKY et al. 1985). Die verwendeten immunhistochemischen Protokolle

variieren. Hauptsächlich wurde die ABC-Methode verwendet (CHOI und KUSEWITT 2003, CANGUL et al. 2001, KOENIG et al. 2001, SANDUSKY et al. 1987, SANDUSKY et al. 1985). Manche Autoren verzichteten auf die Demaskierung des Antigens (RUIZ et al. 2005, CANGUL et al. 2001, KOENIG et al. 2001, SANDUSKY et al. 1987, SANDUSKY et al. 1985), während andere den Dampfdrucktopf (CHOI und KUSEWITT 2003) oder Hitze allein (SMEDLEY et al. 2011) verwendeten. Auch die Inkubationszeit des Primärantikörpers reicht von dreißig Minuten (SANDUSKY et al. 1985) bis zu einer Inkubation über Nacht (RUIZ et al. 2005, CHOI und KUSEWITT 2003). Die Färbung ist zumeist zytoplasmatisch und nukleär (RUIZ et al. 2005, RAMOS-VARA et al. 2000, SANDUSKY et al. 1985), welche sich als dichtes, dunkles, diffuses granuläres Präzipitat darstellt (SANDUSKY et al. 1985). Es wird darüber berichtet, dass z.T. nur vereinzelt positive Tumorzellen im gesamten Tumor zu finden sind, während sich dagegen andere Tumore diffus positiv zeigen und wiederum andere Neoplasien positive Stränge von Tumorzellen aufweisen (SANDUSKY et al. 1987, SANDUSKY et al. 1985).

#### 2.6.9.3 HMB45

Verschiedene Autoren versuchten mit dem Antikörper HMB45 auch kanine Melanome zu darzustellen. BERRINGTON und Mitarbeitern konnten mit der ABC-Methode und einer Vorbehandlung mit Trypsin keinerlei Ergebnisse erzielen, und auch RAMOS-VARA und Mitarbeiter versuchten ohne Erfolg, mit einer Antigendemaskierung durch Proteinase K, im Dampfdrucktopf mit einer Pufferlösung pH 6,0 oder einer Behandlung im Dampfdrucktopf mit EDTA-Puffer pH 8,0 eine Reaktion zu erzielen (RAMOS-VARA et al. 2000, BERRINGTON et al. 1994). Erst SULAIMON und Mitarbeiter konnten mit einer speziellen Vorbehandlung eine positive Reaktion bewirken. Die Antigendemas-

kierung erfolgt in diesem Protokoll in der Mikrowelle mit einer Pufferlösung mit pH 6,7. Nach einer Abkühlphase von 30 Minuten erfolgt die Bleichung, indem die Schnitte für 30 Minuten in eine 0,25% Kaliumpermanganatlösung getaucht werden. Nach einer Spülung unter laufendem Wasser folgt ein Bad in 5% Oxalsäure für 2-5 Minuten. Anschließend wird die Immunhistochemie mit einer Biotin-Streptavidin Immunperoxidasetechnik weitergeführt. Der Autor konnte mittels der Vorbehandlung mit Mikrowelle und der Bleichung der Schnitte mit Kaliumpermanganat und Oxalsäure eine Sensivität von 88% erzielen. Ohne diese Vorbehandlung war auch bei diesem Autor keine Reaktion mit HMB45 zu erkennen. Die Reaktion zeigte sich als eine diffuse granuläre zytoplasmatische Färbung innerhalb der Tumorzellen. Es wurden 16 nicht-melanozytäre Tumore (3 Plasmazytome, 3 Fibrosarkome, 3 Plattenepithelkarzinome, 1 maligne Histiozytose, 3 Basalzellentumore, 3 schlecht differenzierte Karzinome) dazu verwendet, die Spezifität von HMB45 zu ermitteln. Von den oben genannten Tumoren reagierte eines von den insgesamt 3 Plasmazytomen positiv, mit einer mäßigen granulären zytoplasmatische Färbung. Die drei Fibrosarkome und eines der insgesamt drei Plattenepithelkarzinome wiesen eine Hintergrundfärbung auf, die sich als ein leichter brauner Film über den ganzen Schnitt hinweg darstellte (SULAIMON et al. 2002). RUIZ und Mitarbeiter versuchten, mit Hilfe eines immunhistochemischen Protokolls nach SULAIMON und Mitarbeitern ebenfalls eine Reaktion mit HMB45 zu erzielen, allerdings ohne Erfolg (RUIZ et al. 2005). SMEDLEY und Mitarbeiter untersuchten anhand eines eigenen Protokolls die Reaktion von HMB45 an kaninen oralen amelanotischen Melanomen. Obwohl eine 100% Spezifität erzielt wurde, war die Sensivität mit 12.20% sehr gering (SMEDLEY et al. 2011).



### **3. MATERIAL UND METHODEN**

Aufgrund der morphologischen Vielfalt der melanozytären Tumorzellen, die andere Tumorarten imitieren, und der fehlenden Pigmentgranula ist es schwierig, nur anhand einer mikroskopischen Untersuchung eines H.E.-Schnittes die Diagnose „amelanotisches Melanom“ zu stellen. In der vorliegenden Dissertation wurde der Versuch unternommen, mittels der Immunhistochemie typische Antigene des Melanozyten nachzuweisen. Außerdem wurde versucht, mit Hilfe der Elektronenmikroskopie Melanosomen in der Tumorzelle zu identifizieren, um amelanotische Melanome sicherer diagnostizieren zu können.

#### **3.1 Untersuchungsmaterial**

##### **3.1.1 Untersuchungsmaterial für die Immunhistochemie**

##### **3.1.1.1 Melanome mit einem amelanotischen Teilbereich vom Hund**

Um eine Immunhistochemie mit verschiedenen Antikörpern etablieren zu können, musste zuerst ein, für den jeweiligen Antikörper passendes, immunhistochemisches Protokoll erarbeitet werden. Der erste Testlauf erfolgte an Melanomen, welche einen amelanotischen Teilbereich aufwiesen. Jeder dieser Tumore stammt aus der Maulhöhle eines Hundes. Aufgrund des Pigments konnte die Diagnose sicher gestellt werden, aber es war trotzdem möglich, das Farbpigment, welches die Antikörper-Antigen Reaktion anzeigt, im amelanotischen Teil zu erkennen. Das gesamte Untersuchungsmaterial stammt aus den archivierten Einsendungen des Instituts für Tierpathologie in München. Auf die Ausnahmen wird in den jeweiligen Abschnitten eingegangen. Es wurden Tumore mit der passenden Diagnose und Lokalisation ausgewählt. Anschließend wurden die Tumore am Mikroskop anhand der vorhandenen H.E.-/ und Giemsa-Schnitte auf ihre Brauchbarkeit beurteilt. Es wurde darauf

geachtet, dass pigmentierte Tumorzellen vorhanden waren, so dass eine sichere Diagnose möglich war. Auch wurde darauf Wert gelegt, dass ein ausreichend großer amelanotischer Bereich für die Immunhistochemie vorhanden war. Weiter mussten eine gut erhaltene Zellmorphologie und ein zum größten Teil geschlossener Zellrasen vorhanden sein, als Voraussetzung für die Immunhistochemie und zur leichteren Beurteilung derselben. Eine Aufstellung der untersuchten Tumore findet sich in Tabelle 5.



**Tab. 5:** Melanome, mit einem amelanotischen Teilbereich vom Hund

<b>Nummer</b>	<b>Rasse</b>	<b>Alter</b>	<b>Lokalisation</b>
E 375/09	Mischling	13 Jahre	Lefze
E 579/09	Jack Russel Terrier	12 Jahre	Maulschleimhaut
E 601/09	Eurasier	13 Jahre	Zunge
E 2894/08	Berner Sennenhund	11 Jahre	Maulschleimhaut
E 2770/08 <sub>2</sub>	Yorkshire Terrier	12 Jahre	Gingiva
E 3145/95	Dt. Drahthaar	-	Maulhöhle
E 1688/07	Cairn Terrier	11 Jahre	Gingiva
E 497/06	Pudel	10 Jahre	Maulhöhle
E 236/06	Dt. Schäferhund	4 Jahre	Lefze
E 1021/97	Pudel	10 Jahre	Oberkiefer P4
E 1920/06	Pudel	15 Jahre	Gingiva
E 2727/07	Schnauzer-Mischling	15 Jahre	Lefze
E 297/04	Mischling	11 Jahre	Lefze
E 634/05	Rottweiler	8 Jahre	Gaumen
E 1429/04	Lhasa Apso	13 Jahre	Unterkiefer
E 2105/07	Schnauzer-Mischling	14,5 Jahre	Lefze
E 349/05	Mischling	14 Jahre	Lefze
E 543/04	Mischling	11 Jahre	Gaumen
E 493/07	Dobermann	11,5 Jahre	harter Gaumen
E 1133/04	Langhaardackel	13 Jahre	Gingiva
E 451/05	Riesenschnauzer	8 Jahre	Gaumen
E 2511/04	Mischling	13 Jahre	Lefze
E 512/06	Mischling	15 Jahre	Maulhöhle
E 1920/06	Pudel	15 Jahre	Gingiva
E 1482/96	Chow Chow	10 Jahre	Zungengrund
E 3151/99	Yorkshire Terrier	14 Jahre	Lefze
E 3401/92	Cocker	15 Jahre	Oberkiefer P4
E 1053/91	Münsterländer	11 Jahre	Maulhöhle
E 701/92	Cocker	14 Jahre	Gingiva
E 35/91	Rauhaardackel	11 Jahre	Oberkiefer
E 2010/91	Collie	2 Jahre	Unterlippe innen
E 2439/92	Pudel	15 Jahre	Maulhöhle
E 936/95	Mischling	16 Jahre	Oberkiefer
E 1473/96	Rottweiler	6 Jahre	Unterkiefer innen
E 3394/00	Dackel-Mischling	10 Jahre	Maulhöhle

Durch die Literaturrecherche gefunden Protokolle, den Informationen des Datenblattes des jeweiligen Antikörpers und den Erfahrungen des Institutes mit der Immunhistochemie wurden für die ausgewählten Antikörper HMB45, MelanA und S100 eigene immunhistochemische Protokolle erarbeitet. Die unterschiedlichen Protokolle wurden an jeweils drei kaninen Melanomen mit einem amelanotischen Teilbereich getestet. Mit der besten Methode wurde weitergearbeitet. Jeder Block wurde so lange verwendet, bis das Material aufgebraucht wurde.

#### 3.1.1.2     Andere differentialdiagnostisch relevante Tumorarten

Anschließend wurde der jeweilige Antikörper an anderen differentialdiagnostischen relevanten Tumorarten der Maulhöhle mit dem erarbeiteten Immunhistochemieprotokoll getestet. Dies war nötig, um mögliche Kreuzreaktionen, und damit falsch positive Diagnosen, ausschließen zu können. Die Blöcke wurden so lange verwendet, bis das Material aufgebraucht war. Dann wurde der nächste Tumor aus dem Archiv ausgesucht und verwendet. Es wurden jeweils drei Fibrosarkome, Plattenepithelkarzinome, Mastzellentumore, Lymphome und Ameloblastome getestet (s. Tabelle 6).

**Tab. 6:** Differentialdiagnostisch relevante Tumorarten, lokalisiert in der Maulhöhle, die dazu verwendet wurden, um immunhistochemische Kreuzreaktionen auszuschließen.

<b>Nummer</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Rasse</b>	<b>Alter</b>
E 701/09	Fibrosarkom	Maulschleimhaut	Golden Retriever	10 Jahre
E 521/07	Fibrosarkom	Maulschleimhaut	Rottweiler-Mischling	12 Jahre
E 1522/09	Fibrosarkom	Lefze	Mischling	5 Jahre
E 521/07	Fibrosarkom	Maulschleimhaut	Rottweiler-Mischling	12 Jahre
E 1084/08	Plattenepithelkarzinom	Maulschleimhaut	Mischling	11 Jahre
E 1253/06	Plattenepithelkarzinom	unterhalb Zunge	Eurasier	6 Jahre
E 348/07	Plattenepithelkarzinom	Maulschleimhaut	Mischling	12 Jahre
E 661/09	Mastzellentumor	Zunge	Sheltie	5 Jahre
E 224/94	Mastzellentumor	Oberlippe rechts	Pudel-Mischling	11 Jahre
E 1776/09	Mastzellentumor	Lefze	Mischling	7 Jahre
E 1884/91	Mastzellentumor	Lefze	Mischling	12 Jahre
E 502/00	Lymphom	Lefze	Mischling	8 Jahre
E 2133/04	Lymphom	Innenseite Unterkiefer	Mischling	11 Jahre
E 1443/09	Lymphom	Maulhöhle	Mischling	10 Jahre
E 819/95	Lymphom	Maulschleimhaut	Boxer	11 Jahre
E 1204/95	Lymphom	Zunge	Dt. Schäferhund	7 Jahre
E 649/06	Ameloblastom	Unterkiefer	Labrador	8 Jahre
E 1046/98	Ameloblastom	Zahnfleisch	Chow Chow	7 Jahre
E 191/98	Ameloblastom	Zahnfleisch	Mischling	unbekannt

Wenn dieser Arbeitsschritt erfolgreich abgeschlossen war, also keine Kreuzreaktionen auftraten, wurden weitere 10 Melanome mit einem amelanotischen Teilbereich vom Hund untersucht, um die Sensitivität des Verfahrens abschätzen zu können.

#### 3.1.1.3 Tumore mit der Differentialdiagnose „amelanotisches Melanom“ vom Hund

Als nächstes wurden die verschiedenen Antikörper HMB45, MelanA und S100 mit dem erarbeiteten immunhistochemischen Protokoll an 20 Tumoren vom Hund getestet. In allen Fällen konnte keine definitive Diagnose anhand der mikroskopischen Untersuchung gestellt werden, aber ein amelanotisches Melanom war eine der Differentialdiagnosen aufgrund der Zellmorphologie, sowie des Alters des Hundes und der Lokalisation des Tumors (s. Tabelle 7).

**Tab. 7:** Kanine Tumore der Maulhöhle, mit der Differentialdiagnose „amelanotisches Melanom“

<b>Nummer</b>	<b>Rasse</b>	<b>Alter</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Zellmorphologie</b>
E 636/01	Westhighland Terrier	10 J.	Maulschleimhaut	rundzellig
E 3444/92	Dt. Drahthaar	13 J.	Gingiva	v.a. rundzellig
E 3501/92	Mops	8 J.	weicher Gaumen	polymorph
E 1256/93	Collie	10 J.	Gingiva	polymorph, spindelzellig
E 2998/98	Dt. Schäferhund	7 J.	rechte Oberlippe	rundzellig
E 2138/96	Schäferhund- Mischung	14 J.	Lefze	spindelzellig
E 7/96	Jagdterrier	11 J.	Gingiva	v.a. rundzellig
E 3383/99	Langhaardackel	--	Lefze	polymorphzellig
E 948/97	Zwergpudel	12 J.	Gingiva	polymorphzellig
E 2438/97	Berner Sennenhund	7 J.	Zungenuntergrund	polymorphzellig
E 2269/00	Mischlingshund	12 J.	rechter Oberkiefer am P <sub>2</sub>	polymorph- und spindelzellig
E 1769/96	Langhaardackel	14 J.	Maulhöhle	rundzellig bis polymorph
E 1753/96	Langhaardackel	15 J.	Maulhöhle	rundzellig, teils spindelzellig
E 1120/92	Zwergpudel	12 J.	Lefze	spindelzellig
E 2293/96	Mischlingshund	11 J.	Mundschleimhaut	polymorphzellig
E 2171/97	Mischlingshund	14 J.	Mundhöhle	spindelzellig
E 2137/09	Do Khyi	9 J.	Maulschleimhaut	rundzellig
E 1733/09	Husky-Mischling	2,5 J.	untere Lefze	rundzellig
E 1964/08	Rauhaardackel	13 J.	Gingiva	spindelzellig
E 1374/02	Dt. Schäferhund	8 J.	weicher Gaumen	polymorphzellig

#### 3.1.1.4 Normales Gewebe vom Hund, das getestet wurde, um mögliche Kreuzreaktionen auszuschließen

Der letzte Schritt war, mögliche Kreuzreaktionen des jeweiligen Antikörpers mit normalem kaninen Gewebe auszuschließen. Folgende Gewebeproben wurden im frischen Zustand entnommen: Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Tonsille, Uterus, Haut, Milz, Dünndarm, Blase, Mamma, Nebenniere, Herz, Lymphknoten, Lunge, Niere, Leber, Zunge, Speicheldrüse, Ovar und Testis. Die Todesursache war in allen Fällen nicht tumorös bedingt.

#### 3.1.1.5 Positivkontrollen

Um eine positive Antigen-Antikörper Reaktion des Immunhistochemieprotokolls am Hund auch sicher als solche erkennen zu können, wurden als Positivkontrolle amelanotische Melanome des Menschen verwendet (s. Tabelle 8). Diese Tumore vom Menschen waren mit etablierten Methoden der Immunhistochemie positiv auf die jeweiligen verwendeten Antikörper getestet worden und somit war eine sichere Diagnose dieser Tumore möglich. Zum anderen konnte das Reaktionsprodukt zweifelsfrei als solches erkannt werden, da kein Pigment vorhanden war. Das Ergebnis der Antigen-Antikörper Reaktion am menschlichen Tumor diente sowohl zur Überprüfung des richtigen Immunhistochemieprotokolls am Hund, als auch als Vorbild für die Reaktion am Hundetumor. Die menschlichen Tumore wurden von der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein, Technische Universität München, zur Verfügung gestellt. Die Positivkontrolle wurde bei jeder Immunhistochemie durchgeführt.

**Tab. 8:** Positivkontrollen

<b>Nummer</b>	<b>Diagnose</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Spezies</b>
4998/08	amelanotisches Melanom	Haut	Mensch
843/10	amelanotisches Melanom	Haut	Mensch

### 3.1.2 Untersuchungsmaterial für die Elektronenmikroskopie

Aus den Einsendungen von Tumorproben, die im zeitlichen Rahmen dieser Dissertation eingingen, wurden Proben für die Elektronenmikroskopie gewonnen. Voraussetzungen waren die Spezies Hund, eine Lokalisation in der Maulhöhle und entweder eine gesicherte Diagnose „Melanom“ aufgrund der Pigmentgranula, sichtbar im H.E.-Schnitt. Oder es war aufgrund der Tumorzellmorphologie die Diagnose „amelanotisches Melanom“ möglich (s. Tabelle 9). Ziel war es, bei diesen Tumoren Melanosomen frühen Stadiums elektronenmikroskopisch nachzuweisen. Bei zwei der ausgewählten Tumoren handelte es sich um Melanome mit einem amelanotischen Teilbereich. Da aufgrund der Pigmentgranula in den Tumorzellen eine gesicherte Diagnose vorlag, sollten auch im amelanotischen Teil elektronenmikroskopisch Melanosomen nachzuweisen sein. Bei einem weiteren Tumor handelte es sich um eine nicht näher einzuordnende rundzellige Neoplasie. Hier wurde der Versuch unternommen, ebenfalls Melanosomen zu identifizieren.

**Tab. 9:** Verwendete Tumore für die Elektronenmikroskopie

<b>Nummer</b>	<b>Rasse</b>	<b>Alter</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Diagnose</b>
E 1733/09	Mischling	2,5 J.	Lefze Innenseite	malignes Melanom
E 2137/09	Do Khyi	9 J.	Maulschleimhaut	rundzellige Neoplasie
E 579/09	Jack Russel Terrier	12 J.	Maulschleimhaut	malignes Melanom

## **3.2 Fixation**

### **3.2.1 Fixation für die Paraffineinbettung**

Die Tumore bzw. Tumorproben wurden in formalinenthaltenden Behältnissen eingesendet. Bei Ankunft wurde die Größe, Morphologie und der Fixierungsgrad der eingesendeten Proben registriert. Gegebenenfalls wurden die Gewebeteile verkleinert und ein zweites Mal ins Formalin (SAV Liquid Production) zum Nachfixieren gelegt. Die Gewebestücke fixierten für mindestens 24 Stunden.

### **3.2.2 Fixation für die Epoxidharzeinbettung**

Von den Einsendungen, die für diese Dissertation geeignet waren, wurden sowohl Schnitte für Übersichtsfärbungen als auch Schnitte für die Immunhistochemie und Semidünnschnitte für die Elektronenmikroskopie angefertigt. Von den mit Formalin fixierten Proben wurden von verschiedenen Lokalisationen maximal 1 x 1 x 1 mm große Blöckchen geschnitten und in eine Waschlösung (Sörensen-Phosphatpuffer) gegeben.

#### **Sörensen-Phosphatpuffer 0,067 M (pH 7,4)**

Lösung A:                2,269 g     Kaliumdihydrogenphosphat (neoLab 2830)  
                              ad 250 ml     Aqua dest.

Lösung B:                11,876 g     di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat  
    (neoLab 4820)  
                              ad 1000 ml     Aqua dest.

80,8 ml von Lösung A mit 19,2 ml von Lösung B mischen und den pH-Wert auf 7,4 einstellen.



Als nächstes kamen die kleingeschnittenen Präparate in ein gebrauchsfertiges Fixativ (Osmiumtetroxid) für die Eponeinbettung.

### **Osmiumtetroxid-Lösung 1 % zur Postfixation nach CAULFIELD**

5,0 ml 2 % Osmiumtetroxid-Lösung (ChemPur 006051) in Aqua dest.  
2,0 ml Veronalacetat-Puffer (s.u.)  
2,0 ml 0,1 M Salzsäure (neoLab 1040)  
1,0 ml Aqua dest.  
0,45 g Saccharose (neoLab 5015)

### **Veronalacetat-Puffer (pH 7,6)**

0,735 g 5-5-Diäthylbarbitursäure-Natriumsalz (Merck 6318)  
0,485 g Natriumacetat-3-Hydrat (Merck 6267)  
ad 100 ml Aqua dest.

Die Blöckchen wurden in der Osmiumtetroxid-Lösung zur Nachfixierung und gleichzeitiger Nachkontrastierung zwei Stunden lang in den Kühlschrank (4°C) gestellt.

## **3.3 Einbettung**

### **3.3.1 Paraffineinbettung**

Nach der Fixierung wurden die Gewebestücke für drei Stunden in einer speziellen Flüssigkeit\* gespült. Anschließend folgte die Entwässerung in einem Einbettungsautomaten (Bavimed, Histomaster Modell 2050/Di).

### **\*Spülflüssigkeit (pH 7,2)**

70 g Saccharose (neoLab 5015)  
4,15 g 1 N Salzsäure (Merck 09060)  
ad 1000 ml Aqua dest.

**Entwässerung**

2 x 1,5 h	70 % Ethanol (Bundesmonopolverwaltung für Branntwein)
2 x 1,5 h	96 % Ethanol (Bundesmonopolverwaltung für Branntwein)
2 x 1,5 h	absolutes Ethanol (Bundesmonopolverwaltung für Branntwein)
2 x 30 Min.	Xylol
1,5 h	Xylol

Die Gewebeteile wurden fünf Stunden lang mit 62°C heißem Paraffin (engelbrecht 17932a) durchtränkt. Als nächstes wurden Blöckchen mittels einer Ausgießstation (Medite Medizintechnik, TBS 88 Paraffin Embedding) ausgegossen.

**3.3.2 Epoxideinbettung**

Nach der Nachfixierung erfolgte ein dreimaliges Spülen im Sörensen-Puffer. Die Gewebeproben wurden in einer aufsteigenden Acetonreihe (AppliChem A1582) dehydriert.

**Dehydrierung**

3 x 2 Min.	50 % Aceton (Raumtemperatur)
2 x 10 Min.	70 % Aceton (4°C)
2 x 10 Min.	90 % Aceton (4°C)
2 x 20 Min.	100 % Aceton (4°C) (AppliChem A1582)
1 x 20 Min.	100 % Aceton (Raumtemperatur) (AppliChem A1582)

Jetzt folgte die Infiltration mit einem Aceton/Glycidether 100 Gemisch (1:1) eine Stunde lang bei Zimmertemperatur. Anschließend wurden die Gewebeproben für 2 x 30 Min. in pures Epoxidharz gelegt.

### **Epon-Einbettungsgemisch**

Lösung A:                62 ml     Glycidether 100 (Serva 2104502)  
in 100 ml Dodecenylbernsteinsäureanhydrid (DDSA) (Serva 2075501) lösen.

Lösung B:                100 ml     Glycidether 100 (Serva 2104502)  
in 89 ml Methylnadicanhydrid (MNA) (Serva 2945201) lösen.

3,5 ml   Lösung A

6,5 ml   Lösung B

0,15 ml   p-Dimethyl-aminomethyl-phenol (DMP-30) (Serva 3697501)  
auf dem Magnetrührer (Heidolph GmbH, digital 2002) mischen.

Daran schloss sich die Infiltration mit reinem Glycidether 100 (Serva 2104502) bei Raumtemperatur für 2 x 30 Min. an. Zum Schluss erfolgte die Polymerisation in vorgetrockneten Gelatinekapseln bei 60°C innerhalb von 48 Stunden.

## **3.4            Anfertigen von Gewebeschnitten**

### **3.4.1        Herstellung der Paraffinschnitte**

Mit Hilfe eines Rotationsmikrotoms (Microm HM 315) wurden 3-5 µm dicke Schnitte von den vorher gekühlten Paraffinblöcken abgefertigt. Die so gewonnen Schnitte wurden auf ein 40°C warmes Wasserbad (GfL 1052) gelegt und von dort auf vorher entfettete Objektträger aufgezogen. Die Schnitte trockneten über Nacht in einem Wärmeschrank bei 37°C (Quelle privileg, Prod.-Nr. 652.315.3). Bei Bedarf wurden sie im Wärmeschrank (Quelle privileg, Prod.-Nr. 652.315.3) gelagert. Unmittelbar vor der Weiterverwendung entparaffinierten die Schnitte für 20 Minuten in Xylol. Danach erfolgte die Rehydrierung in einer schrittweise absteigenden Alkoholreihe (absolutes,

96 %, 80 %, 70 %, 50 % Ethanol). Danach wurden die Schnitte in Aqua dest. gespült.

Von allen Einsendungen lagern die auf diese Weise produzierten Paraffinblöcke im Archiv des Institutes für Tierpathologie München. Dieses Material konnte von der Doktorandin genutzt werden.

#### 3.4.2 Herstellung von Paraffinschnitten für die Immunhistochemie

Von den ausgesuchten Fällen lagern sowohl die H.E.- und Giemsa-Schnitte als auch die Paraffinblöcke im Archiv. Die Schnitte wurden unter dem Lichtmikroskop (Leica, Bensheim, Ident-Nr. 122293) hinsichtlich der Zellmorphologie der Tumorzellen beurteilt. Bei den Melanomen mit einem amelanotischen Anteil wurde darauf geachtet, dass dieser Bereich ausreichend groß war. Es wurden jeweils „frische“ Schnitte für die Immunhistochemie angefertigt. Das Anfertigen der Schnitte mit dem Mikrotom ist im oberen Abschnitt schon beschrieben worden. Nur wurden die Schnitte nicht auf entfettete Objektträger aufgezogen, sondern auf beschichtete (engelbrecht, Star Frost, adhäsive Objektträger), um eine bessere Haftung zu erzielen. Diese Schnitte wurden ebenfalls über Nacht in den 37°C warmen Brutschrank (Quelle privileg, Prod.-Nr. 652.315.3) gelegt.

#### 3.4.3 Herstellung von Semi- und Ultradünnschnitten für die Elektronenmikroskopie

Mit einer Fräse (Reichert Ultratrim) wurden die Eponblöcke bis zum Rand der eingebetteten Gewebeprobe getrimmt. Die Gelatine kapsel blätterte bei diesem Prozess ab, so dass sie nicht extra entfernt werden musste. Die Semi-dünnschnitte wurden mit einem Ultramikrotom (Ultracut E, Reichert Jung) angefertigt. Die Schnittdicke lag bei etwa 0,5 µm. Die Schnitte wurden auf

entfettete Glasobjektträger aufgezogen und auf der Heizplatte bei 80°C gestreckt und getrocknet. Die für die Routinefärbungen vorgesehenen Schnitte wurden mehrmals durch die Flamme eines Bunsenbrenners gezogen, um sie hitzezu-fixieren. Die Beurteilung der Semidünnschnitte erfolgte am Lichtmikroskop. Bei den Melanomen mit einem amelanotischen Teilbereich wurde darauf geachtet, dass der ausgewählte Bereich tatsächlich im nicht pigmentierten Bereich lag. Auf einen geschlossenen Zellrasen wurde ebenfalls Wert gelegt. Der geeignete Bereich wurde markiert und das Blöckchen wurde dementsprechend nachgetrimmt. Mittels eines Ultramikrotoms (Ultracut E, Reichert Jung) wurden Ultradünnschnitte mit Schichtdicken von 70 bis 80 nm erstellt. Diese Schnitte wurden auf befilmte Kupferringe (Stork Veco B.B., Niederlande) aufgezogen. Danach erfolgte die Nachkontrastrierung mit Uranylacetat und Bleicitrat für 10 Min..

### **Herstellung von Uranylacetat nach REYNOLDS**

1g Uranylacetat (Agar scientific Ltd. R 126A) in 50 ml Aqua dest. lösen. Vor Gebrauch filtrieren.

### **Herstellung von Bleicitrat nach REYNOLDS**

1,655 g Bleinitrat 1 M (Merck, 7398)	ad 5 ml Aqua dest.
2,94 g Natriumcitrat (Merck, 6448)	ad 10 ml Aqua dest.
1 g NaOH Plätzchen (Merck, 6498)	ad 25 ml Aqua dest.

32 ml Aqua dest.

6 ml Natriumcitrat (s.o.)

unter leichtem Rühren zugeben.

4 ml Bleinitrat (s.o.)

Es bildet sich ein Niederschlag. Lösung wird milchig.

8 ml NaOH (s.o.)

Lösung wird wieder klar. Vor Gebrauch durch einen Hartfilter filtrieren.

Nach Trocknung der Schnitte erfolge die Beurteilung an einem Transmissions-elektronenmikroskop (Zeiss, EM 10) (Planfilme Maco Photoproducts EM-Film ES206).

### 3.5 Übersichtsfärbungen

Die Paraffinschnitte wurden für 20 Min. im Xylolbad (CLN) entparaffiniert. Anschließend in der absteigenden Alkoholreihe (absolutes, 96%, 80%, 70%, 50% Ethanol) rehydriert und in Aqua dest. gespült. Danach erfolgten die Färbungen.

#### 3.5.1 Hämatoxylin / Eosin (H.E.)-Färbung am Paraffinschnitt

5 Min. Mayers-Hämalaun (Merck 09249)

5 Min. spülen unter fließendem Leitungswasser

wenige Sekunden differenzieren in 0,5% Salzsäure-Alkohol\*

5 Min. spülen unter fließendem Leitungswasser

bis 1 Min. Eosin \*\*

spülen in Aqua dest.

*\*0,5% Salzsäure-Alkohol Gebrauchslösung*

*Salzsäure-Alkohol Stammlösung*

7000 ml 96% Alkohol (Bundesmonopolverwaltung für Branntwein)

2500 ml Aqua dest.

100 ml 25% Salzsäure (neoLab 5030)

100 ml Salzsäure-Alkohol Stammlösung

100 ml 70% Alkohol (Bundesmonopolverwaltung für Branntwein)

**\*\*1% Eosin-Lösung**

10g            Eosin (Merck 15935)

1000 ml      Aqua dest.

Eosin in Aqua dest. heiß lösen, dann abkühlen lassen

1,5 ml        100% Eisessig (AppliChem A0820)

anschließend filtrieren.

Daran schloss sich die Dehydrierung in der aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 80%, 96%, absolutes Ethanol) bis zum Xylol (CLN) an. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte mit Histokitt (engelbrecht, 1025/500) eingedeckelt.

**3.5.2            Giemsa-Färbung am Paraffinschnitt*****0,1 M Phosphatpuffer***

Lösung A:

13,61 g       Kaliumdihydrogenphosphat (neoLab 2830)

ad 1000 ml   Aqua dest.

Lösung B:

3,55 g        Dinatriumhydrogenphosphat (neoLab 4820)

ad 250 ml    Aqua dest.

***7% Giemsa-Stammlösung***

97,5 ml       Puffer A

2,5 ml        Puffer B

mischen und erwärmen auf ca. 70 bis 80°C

ad 7 ml       Giemsa-Azur-Eosin-Methylenblaulösung  
(Merck 09204)

Lösung auf pH-Wert 5,0 einstellen und filtrieren.

Die Schnitte wurden nach dem Entparaffieren und der Rehydrierung eine Stunde lang bei 65°C in der Giemsa-Gebrauchslösung gefärbt. Dann folgte die Differenzierung in 100% Essigsäure (AppliChem, A0820), bis zum Farbumschlag von blau nach rot. Anschließend wurden die Paraffinschnitte dehydriert, zuerst mit 96% Ethanol, dann mit absolutem Ethanol und letztendlich Xylol. Die Schnitte wurden ebenfalls mit Histokitt (engelbrecht 1025.500) eingedeckelt.

Sowohl die H.E.- als auch die Giemsa-Färbungen lagern im Archiv des Institutes für Tierpathologie München und konnten im Rahmen dieser Dissertation genutzt werden. Die Proben für die Elektronenmikroskopie wurden im zeitlichen Rahmen der vorliegenden Arbeit gesammelt. Deshalb war es möglich, von diesen Fällen, mit den oben beschriebenen Verfahren, sowohl eigene Paraffinblöcke als auch H.E.- und Giemsa Färbungen anzufertigen.

### **3.6 Immunhistochemie**

#### **3.6.1 Allgemeines**

Ziel der Immunhistochemie war es, mit Hilfe der Antikörper HMB45, MelanA und S100 den melanozytären Ursprung der Tumorzellen nachzuweisen. Für jeden Antikörper wurde eine Reihe von verschiedenen immunhistochemischen Methoden getestet. Bei jedem immunhistochemischen Durchgang wurden die Paraffinschnitte zunächst für 20 Min. in einem Xylolbad entparaffiniert und anschließend in der absteigenden Alkoholreihe rehydriert.

##### **3.6.1.1 Unterdrückung der unspezifischen Hintergrundreaktionen**

Beim Auftreten von unspezifischen Hintergrundreaktionen wurden Maßnahmen ergriffen, um diese zu begrenzen. Routinemäßig erfolgte eine Präinkubation der Schnitte mit unverdünntem Normalserum derjenigen Spezies, von der der Se-



kundärantikörper stammt. Das Normalserum wurde auf die Paraffinschnitte aufgetropft und anschließend erfolgte die Inkubation für 30 Min. bei Raumtemperatur. Gegebenenfalls wurde eine Adsorption des Sekundärantikörpers mit 5%igem Normalserum derjenigen Spezies durchgeführt, von der das zu untersuchende Gewebe stammt. In diesem Fall also Hundeserum.

#### 3.6.1.2 Hemmung der endogenen Peroxidase

Um die endogene Peroxidaseaktivität zu hemmen, wurden die Paraffinschnitte in eine 1%ige Lösung von Wasserstoffperoxid in destilliertem Wasser bzw. Methanol (neoLab 1699) getaucht. Die Inkubation erfolgte für 15 Min. bei Raumtemperatur. Danach wurden die Schnitte im TBS-Puffer für 10 Min. gespült.

#### 3.6.1.3 Demaskierung des Antigens

Die meisten immunhistochemischen Methoden benötigen eine Demaskierung des Antigens. Je nach Antikörper wurden verschiedene Methoden der Vorbehandlungen gewählt, um eine Antigen-Antikörper Reaktion zu erzielen.

### 3.6.2 Immunhistochemie mit HMB45

Begonnen wurde mit HMB45. Es wurden verschiedene Techniken der Immunhistochemie mit HMB45 getestet, um eine Antigen-Antikörper Reaktion zu erzielen.

#### 3.6.2.1 Verwendete Antikörper, Pufferlösungen, Färbungen und Chromogene

##### *Primärantikörper*

monoklonaler Maus anti-human Melanosom Antikörper, Klon HMB45

(DAKO M0634) (PROTOKOLL A-F, außer PROTOKOLL E).

*Sekundärantikörper*

polyklonaler, Peroxidase konjugierter Kaninchen anti-Maus Immunglobulin Antikörper (DAKO PO161) (PROTOKOLL A, PROTOKOLL B, PROTOKOLL C)

polyklonaler biotinylierter Ziege anti-Maus Immunglobulin Antikörper (DAKO E0433) (PROTOKOLL D, PROTOKOLL F)

*Nachweisreagenz*

Avidin-Biotin-Komplex (Elite ABC-Kit, Vector Laboratories, Vectastain®) (PROTOKOLL D, PROTOKOLL F)

*Verwendete Pufferlösungen*

s. 3.6.6

*verwendete Färbungen und Chromogene*

s. 3.6.8 (Färbungen), s. 3.6.7 (Chromogene)

### 3.6.2.2 Beschreibung der immunhistochemischen Protokolle für HMB45

Getestet wurden die indirekte Immunperoxidasemethode und die Avidin-Biotin-Komplex Methode mit unterschiedlichen Vorbehandlungen und Verdünnungen des Primärantikörpers.

**PROTOKOLL A:** *Indirekte Immunperoxidasemethode ohne Vorbehandlung mit Histogreen als Chromogen*

20 Min.	Xylol
mehrere Sekunden	absteigende Alkoholreihe
2 x 10 Min.	spülen in Aqua dest.
15 Min.	1%iges Wasserstoffperoxid in Aqua dest.
10 Min.	spülen in TBS
20 Min.	Normalserum vom Kaninchen, Verdünnung 1:10, bei Raumtemperatur

Primärantikörper: monoklonaler Maus anti-human Melanosom Antikörper, Klon HMB45

1 h	Verdünnungen 1:100, 1:50, 1:20, bei Raumtemperatur
10 Min.	spülen in TBS

Sekundärantikörper: polyklonaler, Peroxidase konjugierter Kaninchen anti-Maus Immunglobulin Antikörper

1 h	Verdünnung 1:100, bei Raumtemperatur
10 Min.	spülen in TBS
unter Sichtkontrolle	Histogreen als Chromogen und 30%iges Wasserstoffperoxid als Substrat
unter Sichtkontrolle	Kernechtrot

Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, Xylol, eindeckeln mit Histokitt (engelbrecht 1025/55).

**PROTOKOLL B:**    *Indirekte Immunperoxidase-methode mit Mikrowelle als Vorbehandlung und Histogreen als Chromogen*

Da die indirekte Methode nicht zum gewünschten Resultat führte, wurde das oben beschriebene Protokoll modifiziert. Die Entparaffinierung und die Rehydrierung blieben gleich. Dann wurde zum Demaskieren des Antigens eine Mikrowellenbehandlung durchgeführt. Die Schnitte wurden in Citratpuffer pH 6,0 für 2 x 10 Min. in die Mikrowelle gestellt. Danach kühlten die Schnitte im Citratpuffer für 20 Min. bei Raumtemperatur ab. Dieses Protokoll wurde mit den Verdünnungen des Primärantikörpers von 1:10 und 1:20 durchgeführt. Der Sekundärantikörper wurde in einer Verdünnung von 1:100 verwendet. Die nachfolgenden Arbeitsschritte sind dem PROTOKOLL A zu entnehmen.

**PROTOKOLL C:**    *Indirekte Immunperoxidase-methode mit Proteinase K als Vorbehandlung und Histogreen als Chromogen*

Da auch die indirekte Immunperoxidase-methode mit Mikrowelle nicht zum Erfolg führte, wurde das Protokoll erneut verändert. Nach der Entparaffinierung und Rehydration der Paraffinschnitte erfolgte das Blockieren der endogenen Peroxidaseaktivität mit Wasserstoffperoxid. Anschließend wurde eine Vorbehandlung mit Proteinase K (DAKO S3020) vorgenommen, wobei das Enzym vor Verwendung 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Anschließend wurden die Schnitte mit dem Enzym beträufelt und bei Raumtemperatur für 10 Min. inkubiert. Danach wurden die Schnitte für 10 Min. im TBS-Puffer gespült. Dann wurde das Normalserum aufgetragen und das weitere Vorgehen erfolgte nach der indirekten Immunperoxidase-methode.

Da immer noch keine Antigen-Antikörper Reaktion sichtbar war, wurde wiederum nach einer neuen Methode gesucht. Durch die Literaturrecherche fand sich die Publikation von SULAIMON und Mitarbeitern (SULAIMON et al. 2002). Folgendes Verfahren wurde dort beschrieben:

**PROTOKOLL nach SULAIMON und Mitarbeitern (2002)**

keine Zeitangabe	Xylol
keine Zeitangabe	absteigende Alkoholreihe
30 Min.	Blockieren der endogenen Peroxidase mit 3%igem Wasserstoffperoxid in Methanol bei Raumtemperatur

Mikrowelle (800 Watt):

10 Min.	in Citratpuffer pH 6,4
30 Min.	Schnitte im Citratpuffer bei Raumtemperatur abkühlen lassen

Bleichung:

30 Min.	in 0,25%igem Kaliumpermanganat bei Raumtemperatur
5 Min	spülen unter laufendem Wasser
mind. 2 bis 5 Min	in 5%ige Oxalsäure tauchen
keine Zeitangabe	spülen in TBS

Immunhistochemie: Biotin-Streptavidin Immunperoxidase Technik

10 Min.	„universal blocking reagent“ (Power Block®, BioGenex) bei Raumtemperatur
keine Zeitangabe	spülen in TBS

Primärantikörper: monoklonaler Maus anti-human Melanosom Antikörper, Klon HMB45 (Signet Laboratories, Dedham, MA, USA).

18 h                      Verdünnung 1:10, in PBS mit einem Trägerprotein  
in 0,9% Natriumazid (BioGenex) bei Raumtemperatur

3 Min.                      spülen in TBS

Sekundärantikörper: vorverdünnter biotinylierter Ziege anti-Maus Immunglobulin Antikörper (kommerziell erhältliches Färbekit, BioGenex)

30 Min.                      bei Raumtemperatur

Nachweisreagenz: Peroxidase konjugierter Streptavidin Super Sensitive label (bioGenex) (keine näheren Angaben)

5 Min.                      3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid als Chromogen (kein Substrat angegeben)

keine Zeitangabe      Mayers-Hämalaun

Entwässerung und eindeckeln.

Als erstes wurde ein Protokoll entwickelt, welches sich am Original orientierte. Allerdings wurde statt des 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid Histogreen (Linaris Biologische Produkte E109) als Chromogen verwendet, um eine Verwechslung zwischen Reaktionsprodukt und Pigmentgranula zu vermeiden.

**PROTOKOLL D:**    *Avidin-Biotin-Komplex Methode mit Mikrowelle und Bleichen als Vorbehandlung und Histogreen als Chromogen*

20 Min.                      Xylol

mehrere Sekunden      absteigende Alkoholreihe

mehrere Sekunden      spülen in Aqua dest.

30 Min.                      Wasserstoffperoxid 3%ig in Methanol (neoLab 1600) bei Raumtemperatur

5 Min.                      spülen in TBS

## Mikrowelle (800 Watt):

2 x 10 Min.	in Citratpuffer pH 6,0
20 Min.	Schnitte im Citratpuffer abkühlen lassen bei Raumtemperatur
5 Min.	spülen in TBS

## Bleichung:

30 Min.	in 0,25%igem Kaliumpermanganat
5 Min.	spülen unter laufendem Wasser
unter Sichtkontrolle, 1, 2, 3,	
4, 5 Min.	in 5%iger Oxalsäure
5 Min.	spülen in TBS
30 Min.	Normalserum von der Ziege, Verdünnung 1:10, bei Raumtemperatur

Primärantikörper: monoklonaler Maus anti-human Melanosom Antikörper, Klon HMB45

18 h	Verdünnung 1:10, bei Raumtemperatur
2 x 5 Min.	spülen in TBS

Sekundärantikörper: biotinylierter Ziege anti-Maus Immunglobulin Antikörper

30 Min	Verdünnung 1:200, absorbiert mit 5%igem Hundeserum, bei Raumtemperatur
5 Min.	spülen in TBS

Nachweisreagenz: Avidin-Biotin-Komplex

30 Min.	Verdünnung 1:100, bei Raumtemperatur
5 Min.	spülen in TBS

unter Sichtkontrolle Histogreen als Chromogen und 30%iges  
Wasserstoffperoxid als Substrat

mehrere Sekunden spülen in Aqua dest.

unter Sichtkontrolle Kernechtrot

mehrere Sekunden spülen in Aqua dest.

Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, Xylol, eindeckeln mit Histokitt  
(engelbrecht 1025/500).

Beim ersten Versuch wurde die 5%ige Oxalsäure unter Sichtkontrolle  
aufgetragen und bei Farbloswerden des Schnittes abgegossen. Dann wurde  
versucht, durch Veränderung der Einwirkzeit der 5%igen Oxalsäure eine bessere  
Antigen-Antikörper Reaktion zu erzielen. Es wurde am Präparat 2894/08 eine  
Einwirkzeit von 1, 2, 3, 4 und von 5 Min. der 5%igen Oxalsäure getestet.

Das Resultat war noch nicht zufriedenstellend, und das Protokoll wurde noch  
weiter an das Original angelehnt. Als nächstes wurde der Bleichungsschritt  
überprüft. Dieser Vorgang diene laut SULAIMON und Mitarbeitern (2002)  
zwei Zwecken. Zum einen wurden eventuell vorhandene Pigmentgranula  
gebleicht. Dies hatte den Vorteil, dass die Pigmente nicht mit dem 3,3'-  
Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-Reaktionsprodukt verwechselt werden  
konnten. Zum anderen ist das Bleichen ein notwendiger Vorgang, um das  
Antigen zu demaskieren. Ohne das Bleichen ist keine Antigen-Antikörper  
Reaktion möglich.

**Protokoll E:**            *Überprüfung des Bleichungsschrittes*

20 Min.                    Xylol

mehrere Sekunden    absteigende Alkoholreihe

mehrere Sekunden    spülen in Aqua dest.



30 Min.	Wasserstoffperoxid 3%ig in Methanol bei Raumtemperatur
---------	--

5 Min.	spülen in TBS
--------	---------------

Bleichung:

0,5 g Kaliumpermanganat (Merck 5082)

ad 200 ml Aqua dest.

30 Min.	Inkubation der Schnitte im 0,25%igen Kaliumpermanganat
---------	--

5 Min.	spülen unter laufendem Wasser
--------	-------------------------------

1,25 g Oxalsäure (Merck 495)

ad 25 ml Aqua dest.

unter Sichtkontrolle	auftropfen der 5%igen Oxalsäure auf die einzelnen Schnitte, abgießen der Flüssigkeit bei Farbloswerden des Schnittes
----------------------	--

5 Min.	spülen in TBS
--------	---------------

mehrere Sekunden	spülen in Aqua dest.
------------------	----------------------

2 Min.	färben mit Mayers-Hämalaun (Merck 09249)
--------	--

5 Min.	spülen unter laufendem Wasser
--------	-------------------------------

mehrere Sekunden	spülen in Aqua dest.
------------------	----------------------

Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, Xylol, eindeckeln mit Histokitt (engelbrecht 1025/500).

Der Bleichungsschritt verlief erfolgreich, d.h. die Pigmentgranula waren gebleicht. Deshalb wurde jetzt ein Protokoll entwickelt, welches sich so nah wie möglich am Original von SULAIMON und Mitarbeitern (2002) orientierte, da eine Verwechslung des 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid mit den Pigmentgranula ausgeschlossen war.

**PROTOKOLL F:** *Avidin-Biotin-Komplex Methode mit HMB45 mit Mikrowelle und Bleichen als Vorbehandlung und 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid als Chromogen*

Entparaffinierung und Rehydrierung

mehrere Sekunden	spülen in Aqua dest.
30 Min.	Wasserstoffperoxid 3%ig in Methanol bei Raumtemperatur
5 Min.	spülen in TBS

Mikrowelle (800 Watt):

2 x 10 Min.	in Citratpuffer pH 6,0
20 Min.	Schnitte im Citratpuffer abkühlen lassen bei Raumtemperatur
5 Min.	spülen in TBS

Bleichung:

30 Min.	im 0,25 %igen Kaliumpermanganat
5 Min.	spülen unter laufendem Wasser
1 Min.	in 5%iger Oxalsäure
5 Min.	spülen in TBS
30 Min.	Normalserum von der Ziege, Verdünnung 1:10, bei Raumtemperatur

Primärantikörper: monoklonaler Maus anti-human Melanosom Antikörper, Klon HMB45

18 h	Verdünnung 1:10, bei Raumtemperatur
2 x 5 Min.	spülen in TBS

Sekundärantikörper: biotinylierter Ziege anti-Maus Immunglobulin Antikörper

30 Min	Verdünnung 1:200, absorbiert mit 5%igem Hundeserum, bei Raumtemperatur
5 Min.	spülen in TBS

Nachweisreagenz: Avidin-Biotin-Komplex

30 Min.	Verdünnung 1:100 bei Raumtemperatur
2 x 5 Min.	spülen in TBS
5 Min. bzw. 10 Min.	3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid als Chromogen und 30%igem Wasserstoffperoxid als Substrat
5 Min.	spülen unter laufendem Wasser
3 Min.	Mayers-Hämalaun
5 Min.	spülen unter laufendem Wasser
mehrere Sekunden	spülen in Aqua dest.

Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, Xylol, eindeckeln mit Histokitt (engelbrecht 1025/500).

Dieses Protokoll führte bei allen 13 kaninen Melanomen (s. 3.1.1 Tab. 5) zu einer positiven Antigen-Antikörper Reaktion. Um die Spezifität dieser Reaktion zu testen, wurde das PROTOKOLL F an weiteren Tumorarten (s. 3.1.2 Tab. 6) angewendet.

Da sich die Reaktion als unspezifisch erwiesen hat, wurden folgende 8 wenig pigmentierte Melanome ausgewählt, die positiv für HMB45 waren: E 2894/08, E 451/05, E 297/04, E 634/05, E 579/09, E 497/06, E 236/06, E 502/00. Diese ausgewählten Tumore durchliefen wiederum das PROTOKOLL F. Allerdings wurden statt HMB45 andere Primärantikörper (CD3, CD20, Zytokeratin, CD117) verwendet. Dieser Arbeitsschritt sollte beweisen, dass die Demaskierung des Antigens durch die Bleichung nicht spezifisch melanozytäre Antigene

demaskiert. Die Bleichung führt zu einer unspezifischen Freilegung von Antigenen, die zu einer unspezifischen Antigen-Antikörper Reaktion führen. Ansonsten wurden die Arbeitsschritte am PROTOKOLL F nicht verändert.

### 3.6.3 Immunhistochemie mit MelanA

#### 3.6.3.1 Verwendete Antikörper, Pufferlösungen, Färbungen und Chromogene

##### *Primärantikörper*

monoklonaler Maus anti-human MelanA Antikörper, Klon A103 (DAKO M7196)

##### *Sekundärantikörper*

biotinylierter Ziege anti-Maus Immunglobulin Antikörper (DAKO E0433)

##### *Nachweisreagenz*

Avidin-Biotin-Komplex (Elite ABC-Kit, Vector Laboratories, Vectastain®)

##### *Verwendete Pufferlösungen*

s. 3.6.6

##### *verwendete Färbungen und Chromogene*

s. 3.6.8 (Färbungen) und s. 3.6.7 (Chromogene)

#### 3.6.3.2 Beschreibung des immunhistochemischen Protokolls für MelanA

Die Erprobung des Protokolls wurde an 13 wenig pigmentierten Melanomen vom Hund durchgeführt. Da jetzt keine Bleichung mehr verwendet wurde, wurde nur noch der am wenigsten pigmentierte Bereich ausgewertet. Der amelanoti-

sche Teilbereich wurde auf dem H.E.-Schnitt unter dem Mikroskop markiert. Dieser Bereich wurde auf den Schnitt, der für die Immunhistochemie vorgesehen war, übertragen. Der restliche Bereich des Schnittes wurde entfernt. Zum Vergleich wurden 4 wenig pigmentierte Melanome vom Hund nur mit Mayers-Hämalaun (Merck 09249) gefärbt, um sie jeweils mit dem Immunhistochemieschnitt zu vergleichen.

Folgendes Protokoll wurde für die Immunhistochemie mit MelanA verwendet:

**PROTOKOLL G:** *Avidin-Biotin-Komplex Methode mit MelanA mit Mikrowelle als Vorbehandlung und 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid als Chromogen*

Entparaffinierung und Rehydrierung

mehrere Sekunden    spülen in Aqua dest.

Mikrowelle:

2 x 10 Min.	in TBS/EDTA-Puffer pH 9,0
20 Min.	Schnitte im TBS/EDTA-Puffer pH 9,0 abkühlen lassen, bei Raumtemperatur
15 Min.	1%iges Wasserstoffperoxid in Aqua dest.
10 Min.	spülen in TBS
30 Min.	Normalserum von der Ziege, Verdünnung 1:10, bei Raumtemperatur

Primärantikörper: monoklonaler Maus anti-human MelanA Antikörper, Klon A103

1 h	Verdünnungen 1:10, 1:25, 1:50, bei Raumtemperatur
10 Min.	spülen in TBS

Sekundärantikörper: biotinylierter Ziege anti-Maus Immunglobulin Antikörper

45 Min. Verdünnung 1:200, bei Raumtemperatur, absorbiert mit 5%igem Hundeserum

10 Min. spülen in TBS

Nachweisreagenz: Avidin-Biotin-Komplex

30 Min. Verdünnung 1:100 bei Raumtemperatur

10 Min. spülen in TBS

3-5 Min. 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid als Chromogen und 30%iges Wasserstoffperoxid als Substrat

5 Min. spülen unter laufendem Wasser

40 Sek. Mayers-Hämalaun

5 Min. spülen unter laufendem Wasser

Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, Xylol, eindeckeln mit Histokitt.

Alle 13 ausgewählten kaninen Melanome mit einem amelanotischen Teilbereich (s. 3.1.1 Tab. 5) zeigten eine Reaktion mit MelanA. Die Sensivität des Protokolls war somit gewährleistet. Um Kreuzreaktionen von MelanA mit weiteren Tumorarten auszuschließen, wurde das PROTOKOLL G bei den differentialdiagnostisch relevanten Tumoren (s. 3.1.2 Tab. 6) getestet. Es wurden jeweils drei Fibrosarkome, Plattenepithelkarzinome, Mastzellentumore Lymphome und Ameloblastome auf eine Antigen-Antikörper Reaktion untersucht. Es erfolgte eine Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion von MelanA mit den differentialdiagnostisch relevanten Tumoren. Die Spezifität von MelanA wurde durch diesen Arbeitsschritt bestätigt.

Anschließend wurden 20 kanine Tumore, lokalisiert in der Maulhöhle, mit der Differentialdiagnose „amelanotisches Melanom“ (s. 3.1.3 Tab. 7) mit dem immunhistochemischen PROTOKOLL G untersucht. Dann erfolgte die Beurteilung der Antigen-Antikörper Reaktion am Lichtmikroskop.

Um Kreuzreaktionen von MelanA mit nicht melanozytärem Gewebe auszuschließen, wurde auch normales kanines Gewebe (s. 3.1.4) getestet. Die Gewebeproben (Schilddrüse, Nebenschilddrüse, Tonsille, Uterus, Haut, Milz, Dünndarm, Blase, Mamma, Nebenniere, Herz, Lymphknoten, Lunge, Niere, Leber, Zunge, Speicheldrüse, Ovar und Hoden) durchliefen ebenfalls das immunhistochemische PROTOKOLL G. Auch hier erfolgt eine Beurteilung der immunhistochemischen Reaktion am Lichtmikroskop.

### 3.6.4 Immunhistochemie mit S100

Im Institut der Tierpathologie München wird der Antikörper S100 routinemäßig eingesetzt. Zwei Protokolle werden verwendet.

#### 3.6.4.1 Verwendete Antikörper, Pufferlösungen, Färbungen und Chromogene

##### *Primärantikörper*

polyklonaler Kaninchen anti-S100 Antikörper (DAKO Z0311)

##### *Sekundärantikörper*

biotinylierter Ziege anti-Kaninchen Immunglobulin Antikörper (Vector Laboratories, W2206)

##### *Nachweisreagenz*

Avidin-Biotin-Komplex Elite (ABC-Kit, Vector Laboratories, Vectastain®)

##### *verwendete Pufferlösungen*

s. 3.6.6

##### *verwendete Färbungen und Chromogene*

s. 3.6.8 (Färbungen) und s. 3.6.7 (Chromogene)

## 3.6.4.2 Beschreibung der immunhistochemischen Protokolle für S100

**Protokoll H:**            *Avidin-Biotin-Komplex Methode mit S100 mit Mikrowelle als Vorbehandlung*

## Entparaffinierung und Rehydrierung

mehrere Sekunden    spülen in Aqua dest.

## Mikrowelle:

2 x 10 Min.	in Citratpuffer pH 6,0
20 Min.	abkühlen lassen im Citratpuffer pH 6,0
15 Min.	1%iges Wasserstoffperoxid in Aqua dest.
10 Min.	spülen in TBS
20 Min.	Normalserum von der Ziege, Verdünnung 1:10 bei Raumtemperatur

## Primärantikörper: polyklonaler Kaninchen anti-S100 Antikörper

1 h	Verdünnungen 1:400, 1:300, 1:600. 1:900 bei Raumtemperatur
10 Min.	spülen in TBS

## Sekundärantikörper: biotinylierter Ziege anti-Kaninchen Immunglobulin Antikörper

45 Min.	Verdünnung 1:200 bei Raumtemperatur, absorbiert mit 5%igem Hundeserum
10 Min.	spülen in TBS

## Nachweisreagenz: Avidin-Biotin-Komplex

30 Min.	Verdünnung 1:100 bei Raumtemperatur
10 Min.	spülen in TBS
2-5 Min.	3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid als Chromogen und 30%iges Wasserstoffperoxid als Substrat



5 Min.	spülen unter laufendem Wasser
40 Sek.	Mayers-Hämalaun
5 Min.	spülen unter laufendem Wasser

Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, Xylol, eindeckeln mit Histokitt (enbelbrecht 1025/500).

Mit dem immunhistochemische PROTOKOLL H wurden 13 kanine Melanome mit einem amelanotischen Teilbereich (s. 3.1.1 Tab. 5) untersucht, um die Sensitivität des Protokolls zu ermitteln. Die Beurteilung der Antigen-Antikörper Reaktion erfolgte im Lichtmikroskop. Anschließend wurden jeweils drei der differentialdiagnostisch relevanten Tumore (s. 3.1.2 Tab. 6) getestet. Die Spezifität des PROTOKOLLS H mit dem Antikörper S100 war gering. Deshalb wurde ein weiteres Protokoll, welches im Institut für Tierpathologie verwendet wird, untersucht.

**Protokoll I:**                    *Avidin-Biotin-Komplex Methode ohne Vorbehandlung mit Inkubation des Primärantikörpers S100 über Nacht*

#### Entparaffinierung und Rehydrierung

mehrere Sekunden	spülen in Aqua dest.
5 Min.	spülen in TBS
30 Min.	30%iges Wasserstoffperoxid in Methanol
3 x 5 Min.	spülen in TBS
30 Min.	Normalserum von der Ziege Verdünnung 1:20 bei Raumtemperatur

Primärantikörper: polyklonaler Kaninchen anti-S100 Antikörper

17 h	Verdünnung 1:600 bei 4°C
3 x 5 Min.	spülen in TBS

Sekundärantikörper: biotinylierter Ziege anti-Kaninchen Immunglobulin  
Antikörper

30 Min. Verdünnung 1:200, bei Raumtemperatur

3 x 5 Min. spülen in TBS

Nachweisreagenz: Avidin-Biotin-Komplex

30 Min. Verdünnung 1:100 bei Raumtemperatur

unter Sichtkontrolle 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid als Chromogen und 30%iges Wasserstoffperoxid als Substrat

5 Min. spülen unter laufendem Wasser

30 Sek. Mayers-Hämalaun

5 Min. spülen unter laufendem Wasser

Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, Xylol, eindeckeln mit Histokitt (engelbrecht 1025/500).

Auch mit dem immunhistochemischen PROTOKOLL I wurden zuerst 13 kanine Melanome mit einem amelanotischen Teilbereich untersucht (s. 3.1.1 Tab. 5), um die Sensitivität des Verfahrens zu gewährleisten. Die Beurteilung der Antigen-Antikörper Reaktion erfolgte im Lichtmikroskop. Um die Spezifität des PROTOKOLLS I zu ermitteln, wurden auch mit dieser Methode die differentialdiagnostisch relevanten Tumore (s. 3.1.2 Tab. 6) getestet. Die Spezifität des PROTOKOLLS I war gering.

### 3.6.5 Kontrollen

#### 3.6.5.1 Negativkontrollen

Um sicher zu gehen, dass eine immunhistologische Markierung auf eine spezifische Antigen-Antikörper Reaktion zurückzuführen ist, wurde stets eine Negativkontrolle mitgeführt. Der Primärantikörper wurde durch Normalserum ersetzt.

### 3.6.5.2 Positivkontrollen

Als Positivkontrolle wurden Paraffinschnitte eines amelanotischen Melanoms vom Menschen verwendet, welches eine positive Reaktion auf HMB45, MelanA und S100 gezeigt hat. Die Positivkontrolle diente zum einen der Überprüfung der richtigen Immunhistochemietechnik und zum anderen konnte die Antigen-Antikörper Reaktion der menschlichen Positivkontrolle als Vergleich für die immunhistologische Markierung am kaninen Präparat verwendet werden.

### 3.6.6 Verwendete Pufferlösungen

*Citratpuffer pH 6,0 / 0,01M (für die Mikrowelle)*

2,1 g Zitronensäure-Monohydrat (4345)

ad 1000 ml Aqua dest.

den pH-Wert mit 1 N NaOH (neoLab 5630) auf pH 6,0 einstellen.

*Trisgepufferte Kochsalzlösung (tris-buffered saline, TBS) mit pH 7,6/0,05 M*

Herstellung der Stock-Solution

60,5 g TRIS (neoLab 5670)

in 700 ml Aqua dest.

mit 2 molarer Salzsäure\* auf pH 7,6 einstellen

auf 1000 ml mit Aqua dest. auffüllen

pH-Wert überprüfen

90 g NaCl (neoLab 1230) darin lösen

pH-Wert überprüfen und gegebenenfalls noch mal auf pH-Wert 7,6 einstellen.

\*Herstellung 2 molarer Salzsäure

200 ml      37% Salzsäure (neoLab, 5025.1000)

1000ml      Aqua dest.

Herstellung der Gebrauchslösung

500 ml      der Stock-Solution

in 4500 ml Aqua dest. lösen

den pH-Wert prüfen und gegebenenfalls noch mal auf 7,6 einstellen.

*TBS/EDTA-Puffer pH 9,0*

Herstellung der Gebrauchslösung

2,42 g      TRIS (neoLab 5670)

in 2000 ml Aqua dest. lösen

pH-Wert mit 1 molarer Salzsäure (neoLab 1040) auf pH-Wert 9,0 einstellen.

4 ml 0,4 M EDTA-Lösung pH 8,0 (Sigma-Aldrich) dazu geben

pH-Wert überprüfen und gegebenenfalls noch mal auf 9,0 einstellen.

### 3.6.7      Verwendete Chromogene

*3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid (DAB)*

1 DAB-Tablette (Kem-En-Tec Diagnostics A/S, 4170) in 10 ml Aqua dest. lösen. Lösung für 45 Min. dunkelstellen und danach filtrieren. Kurz vor Gebrauch pro 1 ml Lösung 1 µl 30%iges Wasserstoffperoxid (AppliChem) dazugeben.

*Histogreen (Linaris Biologische Produkte E109)*

Die Substratlösung wird direkt vor Gebrauch angesetzt.

2 Tropfen aus der Tropfflasche Histogreen Chromogen

1 ml Histogreen-Puffer

2 Tropfen 30%iges Wasserstoffperoxid dazugeben.

### 3.6.8 Färbungen

#### *Kernechtrot*

Entparaffinierung und Rehydrierung

5-10 Min. Kernechtrot

spülen in Aqua dest.

entwässern, Xylol, eindeckeln.

\*0,1% Kernechtrotlösung

50g Aluminiumsulfat (Merck 1102)

in 1000 ml Aqua dest.

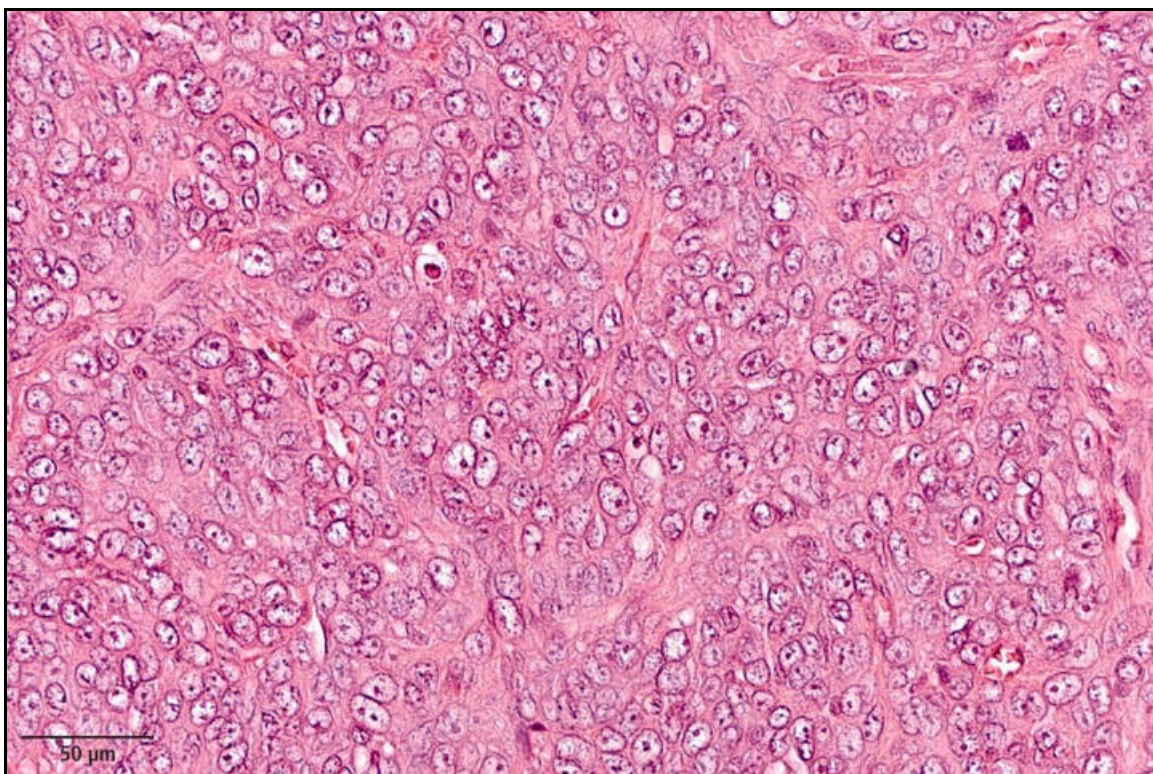
1g Kernechtrot (Merck 59226)

heiß lösen und nach dem Erkalten filtrieren.



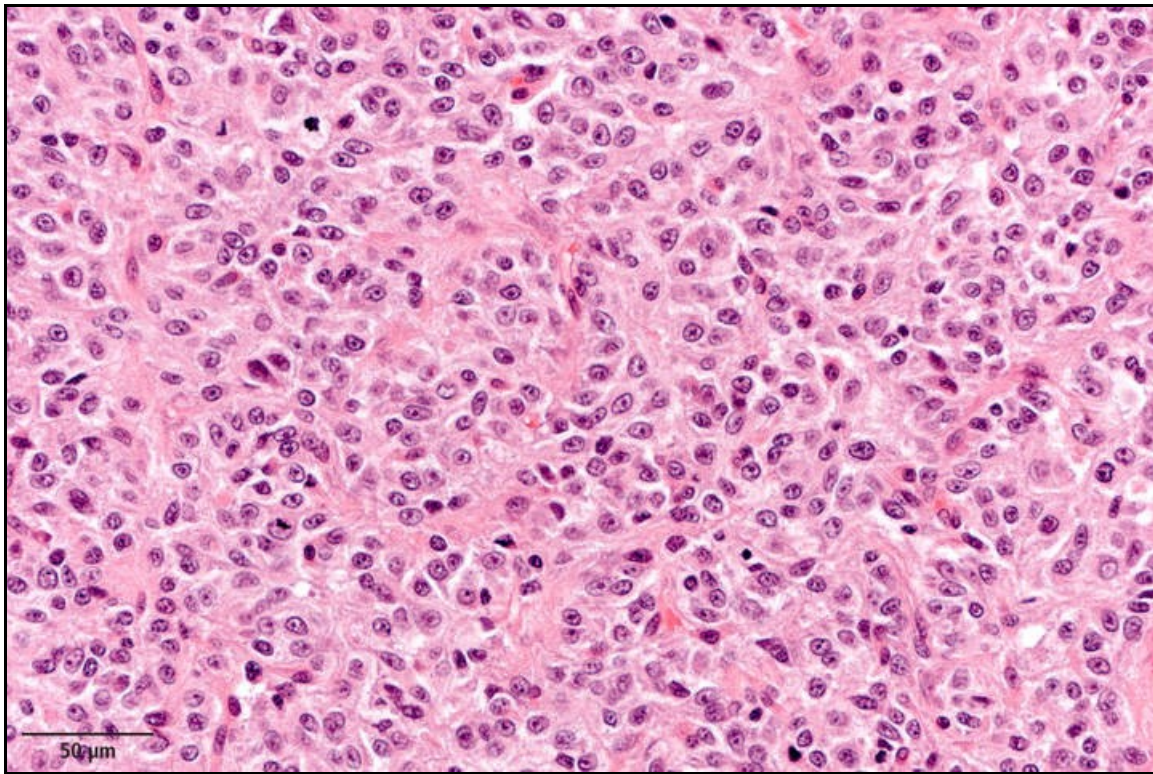
#### 4. ERGEBNISSE

Tumorzellen melanozytären Ursprungs zeigen ein sehr breites Spektrum hinsichtlich ihrer Zellmorphologie. Es finden sich sowohl polymorphe (s. Abb. 16) Tumorzellen als auch rundzellige (s. Abb. 17) und spindelzellige (s. Abb. 18) Tumorzellen.



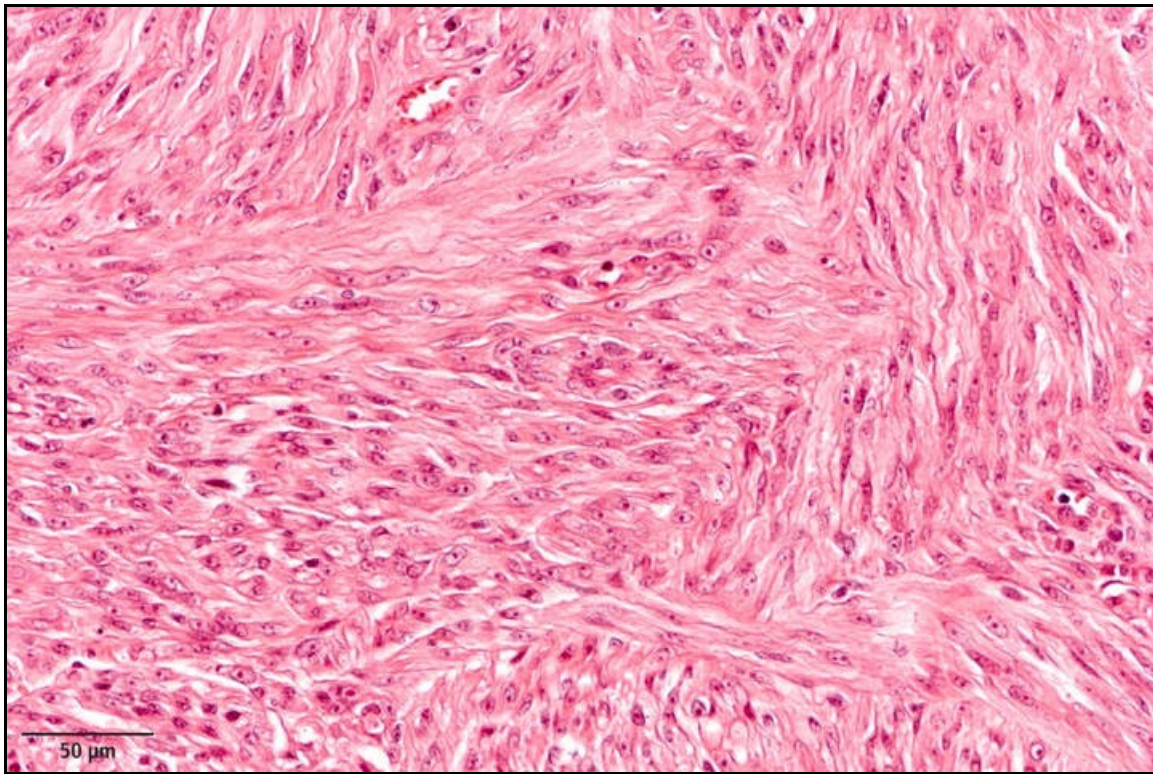
**Abb. 16:** Präparat E 1374/02, H.E.-Schnitt: amelanotisches Melanom vom Hund, lokalisiert in der Maulhöhle, mit polymorphen Tumorzellen.





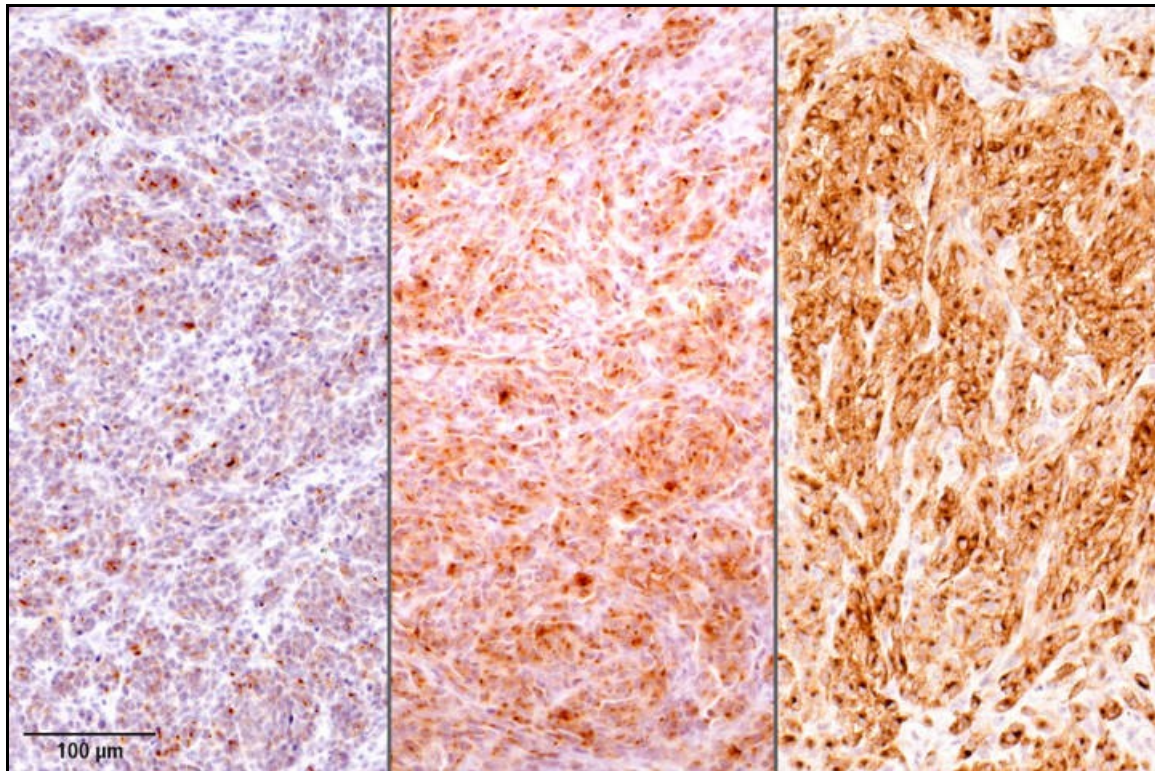
**Abb. 17:** Präparat E 1769/96, H.E.-Schnitt: kanines amelanotisches Melanom, lokalisiert in der Maulhöhle, mit rundzelligen Tumorzellen.





**Abb. 18:** Präparat E 2171/97, H.E.-Schnitt: kanines amelanotisches Melanom, lokalisiert in der Maulhöhle, mit spindelförmigen Tumorzellen.

Die immunhistochemische Reaktion wurde, abhängig von der Reaktionsstärke der reagierenden Tumorzellen, in drei Grade unterteilt: geringgradig, mittelgradig und hochgradig (s. Abb. 19).



**Abb. 19:** Einteilung der Reaktionsgrade, abhängig von der Reaktionsstärke der Antigen-Antikörper Reaktion in den Tumorzellen. Links, Präparat E 3145/95: geringgradige Reaktion. Mitte, Präparat E 3151/99: mittelgradige Reaktion. Rechts, Präparat E 843/10: hochgradige Reaktion.

Außerdem wurden gegebenenfalls die Reaktionsfläche und das Reaktionsmuster berücksichtigt.

#### 4.1 Immunhistochemie mit HMB45

**PROTOKOLL A:** *Indirekte Immunperoxidase-methode ohne Vorbehandlung mit Histogreen als Chromogen*

Dieses Protokoll führte bei keiner der Verdünnungen zu einer spezifischen Antigen-Antikörper Reaktion beim Hund. Nur beim Menschen (Positivkontrol-

le) kam es zu einer positiven Reaktion. Jedoch reagierte auch im menschlichen Tumor nur ca. jede 100ste Zelle. Es kam zu einem mosaikartigen Reaktionsmuster.

**PROTOKOLL B:** *Indirekte Immunperoxidase-methode mit Mikrowelle als Vorbehandlung und Histogreen als Chromogen*

Die Verdünnungen des Primärantikörpers von 1:10 und 1:20 und die Verdünnung des Sekundärantikörpers von 1:100 führten beim Hund zu keinerlei Reaktion. Lediglich beim menschlichen Tumor waren vereinzelte Tumorzellen markiert und ebenso die normalen Melanozyten in der Epidermis.

**PROTOKOLL C:** *Indirekte Immunperoxidase-methode mit Proteinase K als Vorbehandlung und Histogreen als Chromogen*

Dieses Protokoll führte zu keiner immunhistochemischen Reaktion beim Hund. Auch beim Menschen war keine Reaktion zu erkennen.

**PROTOKOLL D:** *Avidin-Biotin-Komplex Methode mit Mikrowelle und Bleichen als Vorbehandlung und Histogreen als Chromogen*

Durch die Verwendung der sensibleren Avidin-Biotin-Komplex Methode statt der indirekten Immunperoxidase-Methode und mit einer Verdünnung des Primärantikörpers von 1:10 war eine Antigen-Antikörper Reaktion möglich. Es wurde die 5%ige Oxalsäure unter Sichtkontrolle aufgetragen und bei Farbloswerden des Schnittes abgegossen. Jedes der drei Melanome zeigte eine geringgradige positive Reaktion der Tumorzellen, die allerdings verwaschen war. Ein Schnitt wies eine leichte Hintergrundfärbung auf. Bindegewebige Strukturen

zeigten keine Reaktion. Um die geringgradige Reaktion zu verstärken, wurden verschiedene Einwirkzeiten der 5%igen Oxalsäure untersucht.

Es wurde bei einem Präparat die Auswirkungen der Einwirkdauer der 5%igen Oxalsäure auf die Antigen-Antikörper Reaktion untersucht (s. Tabelle 10). Es wurde wiederum das PROTOKOLL D verwendet. Die Einwirkdauer der Oxalsäure betrug 1, 2, 3, 4 und 5 Minuten.

**Tab. 10:** Präparat 2894, PROTOKOLL D, Einwirkdauer der 5%igen Oxalsäure unter Sichtkontrolle und von 1, 2, 3, 4 und 5 Min.

Nummer	Einwirkzeit der Oxalsäure	Reaktionsgrad der Tumorzellen	Anmerkungen
E 2894/08	unter Sichtkontrolle	geringgradig-mittelgradig	Bindegewebe reaktionslos
	1 Min.	mittelgradig	Bindegewebe und Epithel reaktionslos
	2 Min.	mittelgradig-hochgradig	Bindegewebe reaktionslos, Epithel mit geringgradigen Hintergrund
	3 Min.	hochgradig	Präparat ist lädiert, Epithel fehlt, Bindegewebe reaktionslos
	4 Min.	hochgradig	Präparat lädiert, vorhandenes Epithel positiv
	5 Min.	hochgradig	Präparat stark lädiert, Epithel und Bindegewebe positiv

Je länger die Einwirkdauer der 5%igen Oxalsäure war, desto unspezifischer war die Reaktion und desto lädiert war das Präparat. Es wurde im Folgenden mit

einer Einwirkzeit der 5%igen Oxalsäure von einer Minute gearbeitet, um eine ausreichende Reaktion zu erzielen, unspezifische Reaktionen zu vermeiden und um das Gewebe zu schonen.

Da in diesem Protokoll die sensiblere Immunhistochemie-Methode, eine sehr niedrige Verdünnung und eine Einwirkzeit von 18 Stunden bei Raumtemperatur verwendet wurden, war eine Verstärkung der Reaktion in diesem Protokoll nicht mehr möglich. Deshalb wurde versucht, das Protokoll noch weiter an das Original von SULAIMON und Mitarbeitern (2002) anzulehnen.

**PROTOKOLL E:** *Überprüfung des Bleichungsschrittes*

Bei allen vier wenig pigmentierten Melanomen (1097/08, 2770/08<sub>2</sub>, 579/09, 2894/08), die zu diesem Versuch ausgewählt wurden, war das Pigment gebleicht. Somit war eine Visualisierung durch das Chromogen 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid möglich, da eine Verwechslung des Reaktionsproduktes mit den Pigmentgranula ausgeschlossen war.

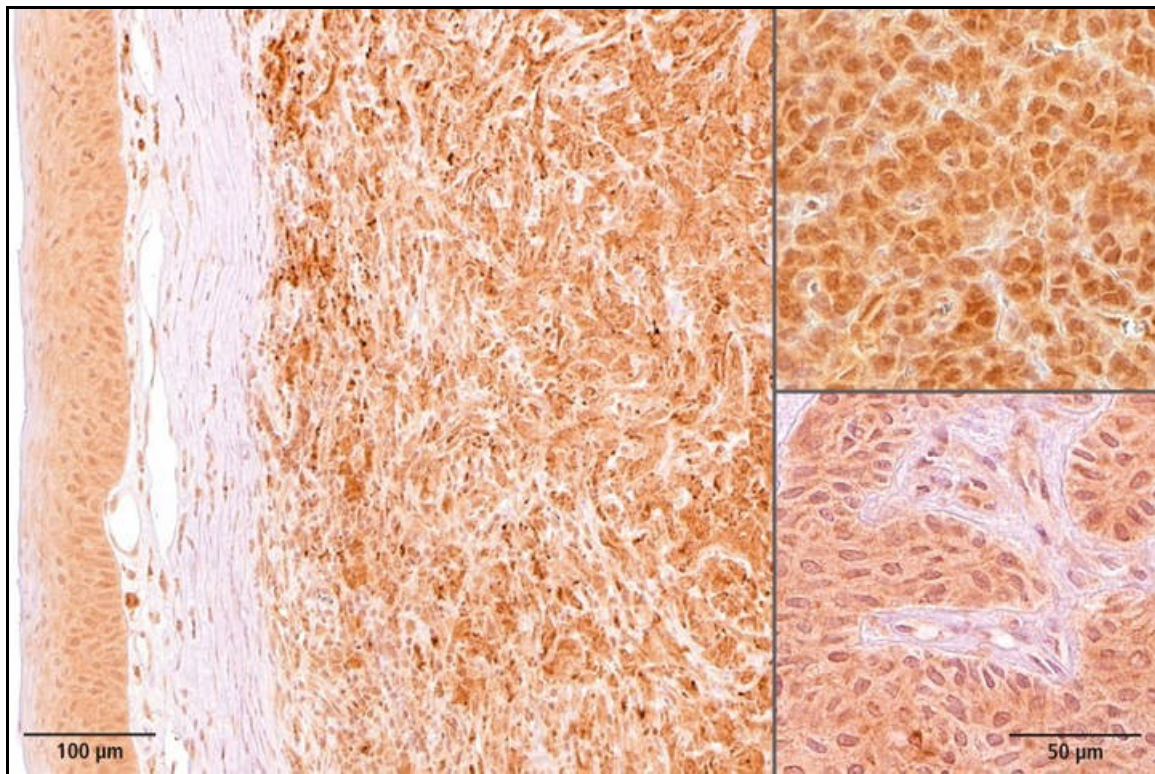
**PROTOKOLL F:** *Avidin-Biotin-Komplex Methode mit HMB45 mit Mikrowelle und Bleichen als Vorbehandlung und 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid als Chromogen*

Das PROTOKOLL F mit einer 5 minütigen Einwirkzeit des 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorids führte zu einer unspezifischen hellbraunen Grundfärbung der Schnitte. Mit einer Einwirkzeit von 10 Min. wurde eine sichtbare Antigen-Antikörper Reaktion in den Tumorzellen erzielt. Das Epithel zeigte z.T. eine unspezifische Hintergrundfärbung. Das Bindegewebe war reaktionslos. Die Tumorbereiche zeigten eine mittelgradige bis hochgradige braune Reaktion (s. Abb. 20). Auffallend war, dass häufig nicht der ganze Tumorbereich reagiert hat, sondern nur einzelne Abschnitte. Das Endothel der Gefäße zeigte z.T. ebenfalls eine Reaktion. Jedes einzelne der getesteten Mela-

nome vom Hund zeigte eine positive Antigen-Antikörper Reaktion. Jedoch fielen bei einigen Präparaten, soweit vorhanden, auch die positiv reagierende Speicheldrüse, die positiv reagierenden Korbzellen, Endothelzellen, Plasmazellen und die positiven Muskelzellen (quergestreift und glatt) auf. Zum Teil waren die Präparate durch die Vorbehandlungen für die Immunhistochemie (Mikrowelle und Bleichung) stark lädiert.

Um die Spezifität des immunhistochemischen PROTOKOLLS F zu überprüfen, wurden jeweils fünf verschiedene Tumorarten und von jeder einzelnen Tumorart jeweils drei Exemplare getestet (s. 3.1.2 Tab. 6). Jeder dieser differentialdiagnostisch relevanten Tumore zeigte eine falsch positive Antigen-Antikörper Reaktion, wenn die Vorbehandlung die Mikrowelle und das Bleichen beinhaltete. Die immunhistochemische Reaktion in den nicht-melanozytären Tumorzellen war nicht von der Reaktion, die die melanozytären Tumorzellen gezeigt hatten, zu unterscheiden. Die differentialdiagnostisch relevanten Tumorarten wiesen ebenfalls wie die Melanome Bereich auf, die eine Reaktion zeigten und andere Bezirke, die keine aufwiesen. Auch in diesen Präparaten reagierten das Epithel, Gefäßendothel und die Muskelzellen zum größten Teil positiv. Nur das Bindegewebe zeigte keine Reaktion. Die Präparate waren ebenfalls manchmal durch die Vorbehandlungen stark lädiert.





**Abb. 20:** Präparat E 191/98, kanines Melanom, lokalisiert in der Maulhöhle, Primärantikörper HMB45, PROTOKOLL F.

Links: Übersicht. Positiv reagierendes Epithel. Das darunterliegende Bindegewebe ist negativ mit vereinzelt positiven Zellen. Der Tumorbereich zeigt eine mittelgradig bis hochgradig positive Reaktion.

Rechts oben: vergrößerter Bereich des linken Bildes. Mittelgradig bis hochgradig positiv reagierende Tumorzellen.

Rechts unten: vergrößerter Bereich des linken Bildes. Negativer Bindegewebsstrang, der von positiv reagierenden Tumorzellen umgeben ist.

Um zu testen, inwiefern sich die Vorbehandlungen (Mikrowelle und Bleichen) auf andere Antigen-Antikörper Reaktionen auswirken, wurde das PROTOKOLL F (DAB 10 Min.) mit anderen Primärantikörpern untersucht. Sieben wenig pig-

mentierte Melanome vom Hund wurden ausgewählt, die eine deutliche Reaktion mit HMB45 (DAKO, M0634) aufwiesen. Diese Tumore durchliefen das PROTOKOLL F. Statt des Primärantikörpers HMB45 (DAKO M0630) wurden der polyklonale Kaninchen anti-human CD3 Antikörper (DAKO A045201), der polyklonale Kaninchen anti-human CD117 Antikörper (DAKO A450229), der monoklonale Maus anti-human CD20 Antikörper (DAKO M75501) und der monoklonale Maus anti-Zytokeratin Antikörper (DAKO 351501) verwendet. Ansonsten blieb das PROTOKOLL F unverändert. Jedes der sieben Melanome reagierte mit dem monoklonalen Maus anti-human CD20 Antikörper (DAKO M75501), dem monoklonalen Maus anti-Zytokeratin Antikörper (DAKO 351501 und mit dem polyklonalen Kaninchen anti-human CD117 Antikörper (DAKO A450229). Aber es reagierte nur einer der sieben Melanome mit dem polyklonalen Kaninchen anti-human CD3 Antikörper (DAKO A045201). Aufgrund dieses Ergebnisses wurde nicht mehr weiter mit HMB45 gearbeitet.

#### 4.1.1 Negativkontrollen mit HMB45

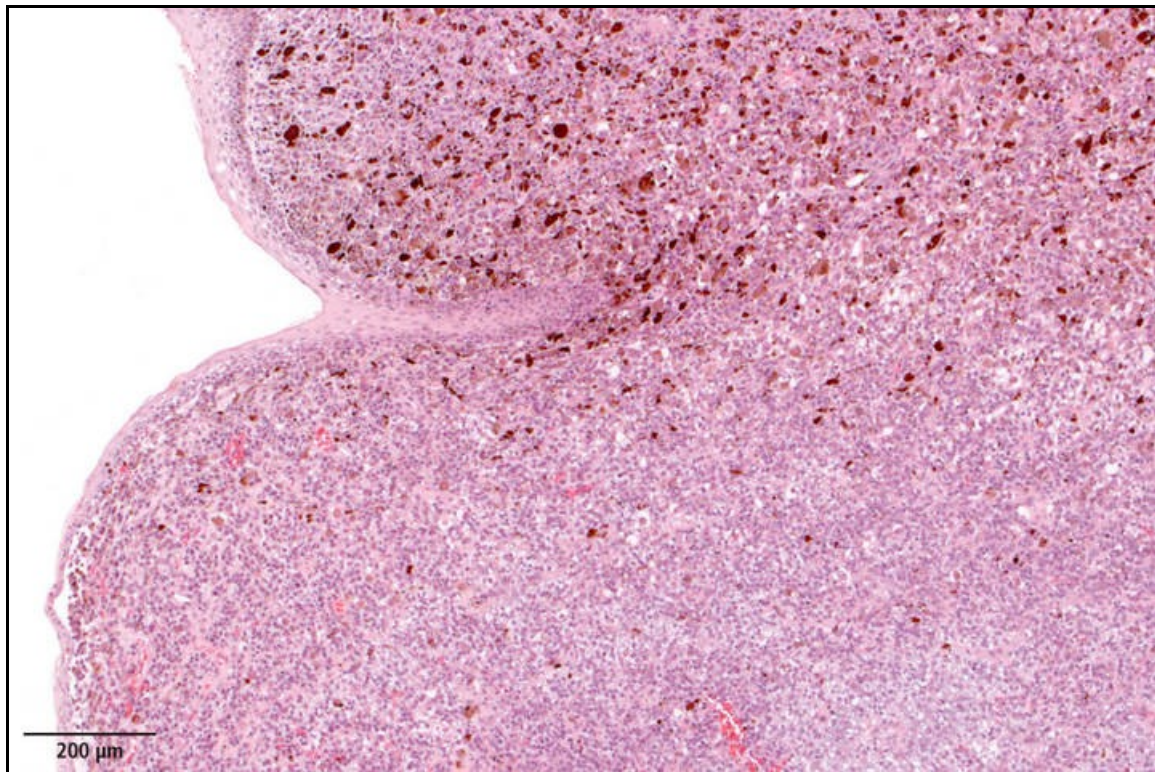
Um ausschließen zu können, dass der Sekundärantikörper mit dem Normalserum oder mit Gewebeteilen reagiert und somit eine falsch positive Reaktion verursacht, wurden Negativkontrollen durchgeführt. Bei diesen Kontrollen wurde der Primärantikörper durch Normalserum ersetzt. In allen Negativkontrollen kam es zu keiner Antigen-Antikörper Reaktion.



## 4.2 Immunhistochemie mit MelanA

**PROTOKOLL G:** *Avidin-Biotin-Komplex Methode mit MelanA und mit Mikrowelle als Vorbehandlung und 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid als Chromogen*

Die ersten Verdünnungsreihen wurden an drei kaninen Melanomen mit einem amelanotischen Teilbereich durchgeführt (s. Abb. 21).



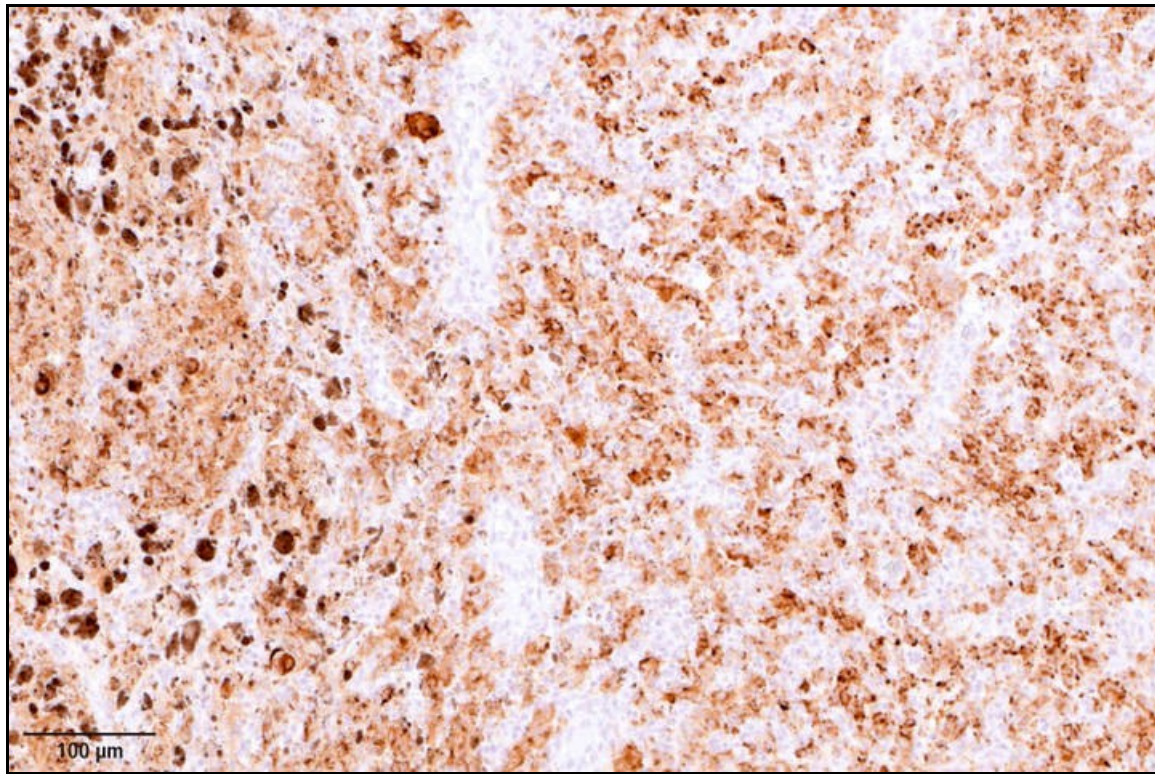
**Abb. 21:** Präparat E 3401/92, H.E.-Schnitt: kanines Melanom, lokalisiert in der Maulhöhle. Der obere Teil des Tumors ist deutlich pigmentiert, der untere Bereich dagegen ist fast amelanotisch.

Als Positivkontrolle diente ein amelanotisches Melanom vom Menschen. Bei der Verdünnung von 1:10 war eine deutlich positive Reaktion im Tumor

zu sehen. Da aber auch unspezifische Reaktionen im Epithel und Gefäßendothel zu sehen waren, wurden noch die Verdünnungen von 1:25, 1:50 und 1:100 untersucht. Bei der Verdünnung von 1:25 waren die unspezifischen Reaktionen schon deutlich zurückgegangen und bei 1:50 waren sie ganz verschwunden, ebenso wie bei 1:100. Da die positive Antigen-Antikörper Reaktion bei 1:100 schwächer ausfiel als bei 1:50, wurde für die restlichen Versuche eine Verdünnung von 1:50 gewählt. Insgesamt wurden 13 Melanome mit einem amelanotischen Teilbereich (s. 3.1.1) vom Hund getestet, die alle eine positive Reaktion zeigten (s. Tabelle 11). Die immunhistochemische Reaktion war deutlich von den Melaningranula zu unterscheiden (s. Abb. 22 und Abb. 23). Außerdem fiel auf, dass häufig nicht der gesamte Tumorbereich reagierte. Es kamen vereinzelt positive Tumorzellen, positive Tumorzellnester und große positive Tumorbezirke vor, auch innerhalb eines Präparates. Die Reaktionsfläche und der Reaktionsgrad waren unabhängig voneinander, d.h. dass eine große Reaktionsfläche nicht zwangsläufig einen hochgradigen Reaktionsgrad nach sich zog. Die Antigen-Antikörper Reaktion stellt sich als zytoplasmatische und/oder fokale Färbung in den Tumorzellen dar (s. Abb. 26 und Abb. 27). Meistens waren beide Muster zu finden.

**Tab. 11:** Insgesamt 13 Melanome mit einem amelanotischen Teilbereich, lokalisiert in der Maulhöhle, PROTOKOLL G, MelanA

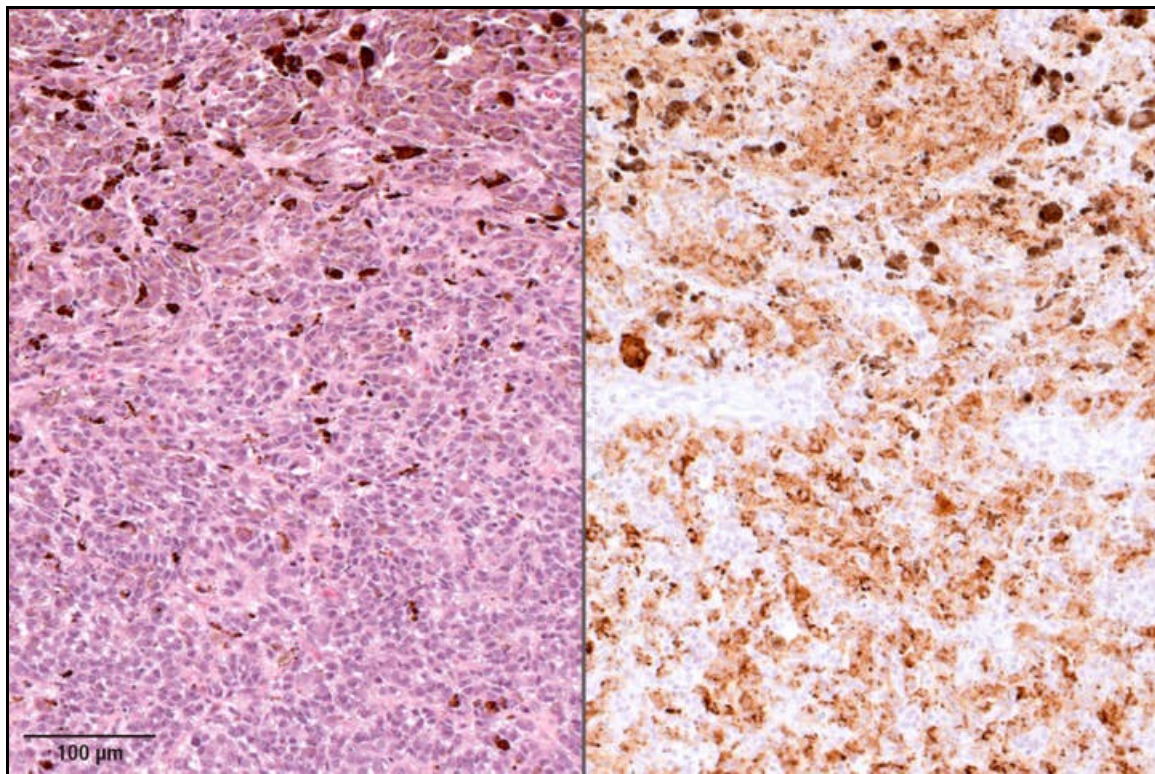
<b>Tumor</b>	<b>Reaktionsgrad</b>	<b>Geschätzte Reaktionsfläche in %</b>	<b>Reaktionsmuster</b>
E 3401/92	hochgradig	85%	zytoplasmatisch und fokal
E 1053/91	mittelgradig-hochgradig	70%	zytoplasmatisch und fokal
E 701/92	mittelgradig-hochgradig	80%	zytoplasmatisch und fokal
E 35/91	geringgradig	20%	zytoplasmatisch und fokal
E 2010/91	hochgradig	90%	zytoplasmatisch und fokal
E 2439/92	hochgradig	30%	zytoplasmatisch und fokal
E 936/35	hochgradig	70%	zytoplasmatisch und fokal
E 1437/96	geringgradig	15%	zytoplasmatisch und fokal
E 1482/96	mittelgradig	60%	zytoplasmatisch und fokal
E 1021/97	mittelgradig-hochgradig	70%	zytoplasmatisch und fokal
E 3151/99	hochgradig	70%	v.a. zytoplasmatisch
E 3145/95	mittelgradig	70%	v.a. zytoplasmatisch
E 3394/00	hochgradig	80%	zytoplasmatisch und fokal



**Abb. 22:** Präparat E 3401/92, kanines Melanom, lokalisiert in der Maulhöhle, Primärantikörper MelanA, PROTOKOLL G. Die hellbraune Färbung stellt die überwiegend zytoplasmatische immunhistochemische Reaktion dar. Im Gegensatz zur immunhistochemischen Reaktion sind die Melaningranula dunkler gefärbt.

Folgende Tumore: E 3151/99, E 1482/86, E 3394/00, E 1021/97 wurden nur mit Hämalaun gefärbt, um den Pigmentierungsgrad mit der Antigen-Antikörper Reaktion zu vergleichen. Beim Vergleich des Hämalaun-Schnittes mit dem Immunhistochemieschnitt, war zu erkennen, dass eine deutliche Antigen-Antikörper Reaktion erfolgte, sichtbar am braunen Präzipitat in den Tumorzellen (s. Abb. 23).





**Abb. 23:** Linke Seite, Präparat E 3401/92: kanines Melanom, nur mit Häma-laun gefärbt, deutlich sichtbar sind die braunen Pigmentgranula. Rechte Seite, Präparat E 3401/92: zum Vergleich die Immunhisto-chemie mit MelanA, PROTOKOLL G. Eine deutliche Antigen-Antikörper Reaktion ist erkennbar, die sich als hellbraune Färbung darstellt. Im Gegensatz zur immunhistochemischen Reaktion sind die Pigmentgranula dunkler gefärbt.

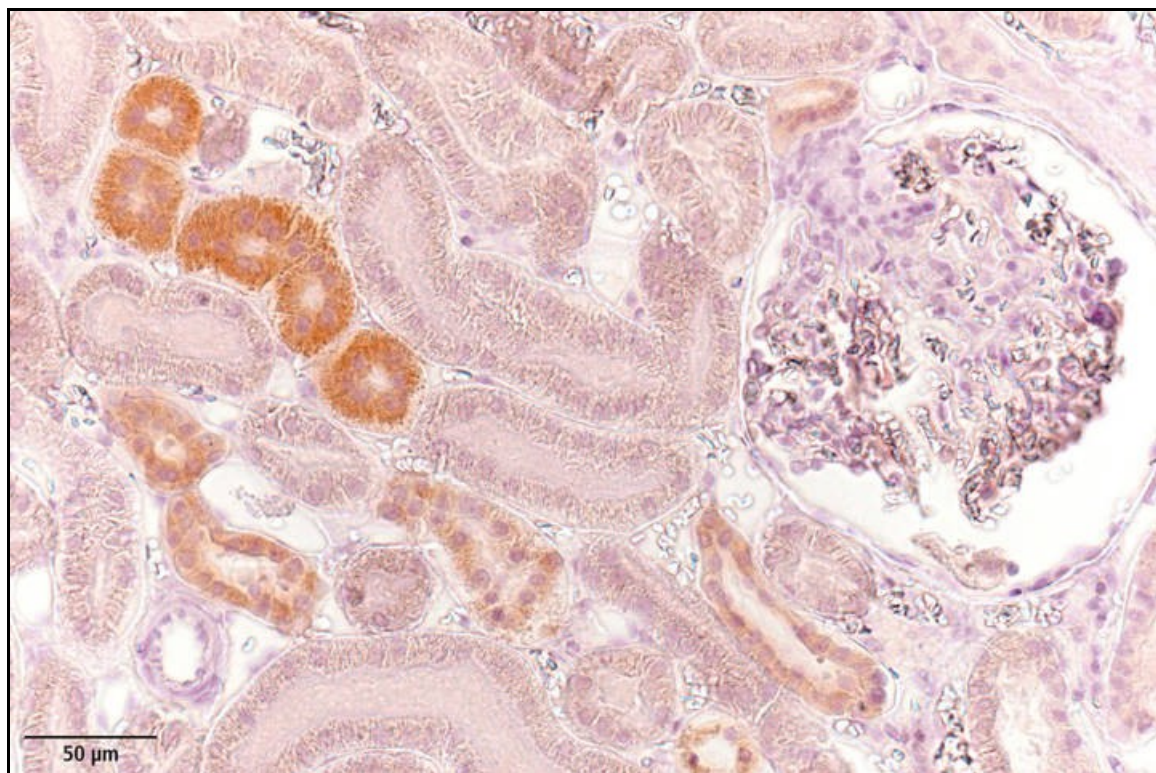
Die untersuchten differentialdiagnostisch relevanten Tumore waren negativ. Nur bei einem Plattenepithelkarzinom kam es zu einer unspezifischen Reaktion in den Tumorzellen, welche sich als leichte verwaschene braune Färbung darstellte. Diese Reaktion ließ sich aber von der Antigen-Antikörper Reaktion in den melanozytären Tumorzellen unterscheiden. Die Epithelien wiesen manchmal ebenfalls eine leichte Hintergrundfärbung auf. Positive Melanozyten waren in den Epithelien ebenfalls zu finden.

Als nächster Schritt wurde normales Gewebe vom Hund mit MelanA getestet (s. Tabelle 12). Die Epithelien wiesen zum größten Teil eine Reaktion auf, welche von verwaschen bis deutlich erkennbar reichte. Eine positive Reaktion zeigten auch die Melanozyten in der Epidermis und in den Haarbälgen, das Kolloid der Schilddrüse, die gesamte Nebennierenrinde, Hepatozyten, Granulosaluteinzellen und Leydigzellen. Die Abbildung 24 zeigt die immunhistochemische Reaktion in der Niere eines Hundes und die Abbildung 25 die Reaktion in der Nebenniere.

**Tab. 12:** Immunhistochemie mit MelanA, PROTOKOLL G am normalen Gewebe vom Hund

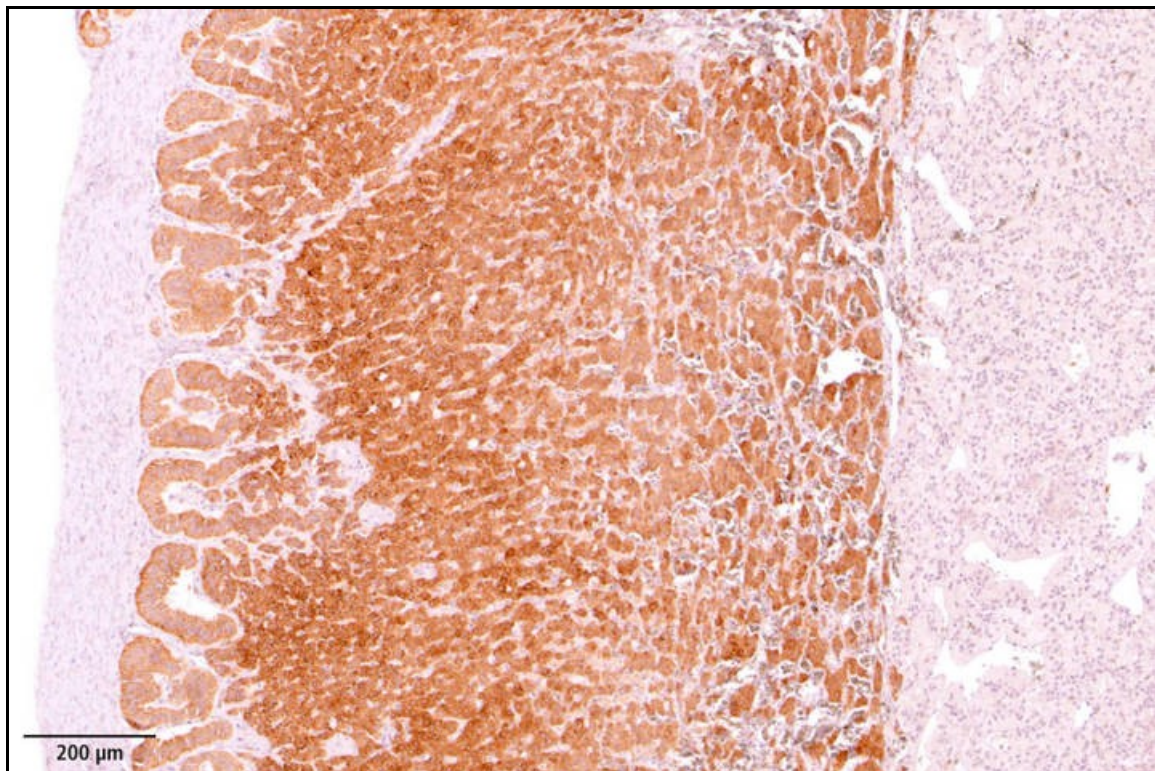
<b>Entnommenes Gewebe</b>	<b>Positiv reagierendes Gewebe mit Reaktionsgrad</b>
Schilddrüse	geringgradig positives Kolloid und Follikel-epithelzellen
Nebenschilddrüse	geringgradig positiv
Pankreas	Gangepithel ungleichmäßig geringgradig positiv
Tonsille	Epithel z.T. geringgradig positiv
Speicheldrüse	Epithel hochgradig positiv
Uterus	Endometrium mittelgradig positiv
Haut	positive Melanozyten in Epithel und Haarbälgen
Milz	
Dünndarm	Epithel geringgradig positiv
Blase	Übergangsepithel mittelgradig positiv
Mamma	
Nebenniere	gesamte Nebennierenrinde hochgradig positiv
Herz	
Lymphknoten	
Leber	Hepatozyten geringgradig positiv

Lunge	mittelgradig positives Bronchus- und Bronchiolusepithel, positive Alveolardeckzellen, z.T. positive Alveolarmakrophagen
Niere	Tubulusepithel z.T. mittelgradig positiv
Zunge	mittelgradig positives Epithel
Ovar	mittelgradig positive Granulosaluteinzellen
Rückenmark	
Testis	Leydigzellen positiv
Nebenhoden	



**Abb. 24:** Immunhistochemische Reaktion in der Niere eines Hundes mit MelanA, PROTOKOLL G. Tubulusepithel ist z.T. negativ, geringgradig-mittelgradig und z.T. hochgradig positiv. Das Glomerulum zeigt keine Reaktion.





**Abb. 25:** Hochgradige immunhistochemische Reaktion in der Nebennierenrinde eines Hundes mit MelanA, PROTOKOLL G.

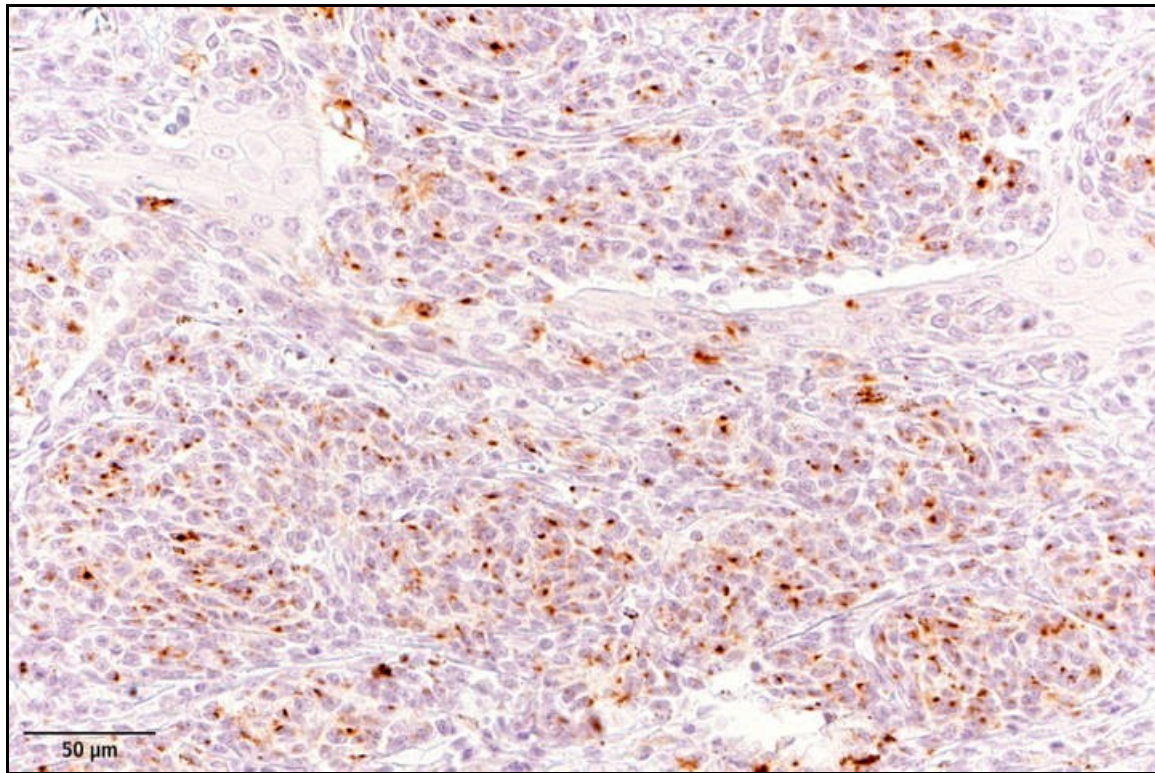
Anschließend wurden die unidentifizierten Tumore mit der Differentialdiagnose „amelanotisches Melanom“ mit Hilfe des PROTOKOLLS G getestet (s. Tabelle 13). Die amelanotischen Melanome zeigten, wie die Melanome mit einem amelanotischen Teilbereich, ein zytoplasmatisches und/oder fokales Reaktionsmuster (s. Abb. 26 und Abb. 27). Nur das fokale Reaktionsmuster trat alleine auf. Wenn das zytoplasmatische Reaktionsmuster zu finden war, war auch das fokale vorhanden. Auch bei den amelanotischen Melanomen konnten z.T. innerhalb eines Präparates sowohl vereinzelt positive Tumorzellen erkennbar sein, als auch große positive Tumorbereiche. Ebenfalls waren bei den amelanotischen Melanomen Reaktionsgrad und Reaktionsfläche unabhängig voneinander. Spindelzellige Tumorzellen reagierten häufig schlechter als rundzellige Tumorzellen. Melanozyten, die in der Epidermis und in den Haarbälgen rea-



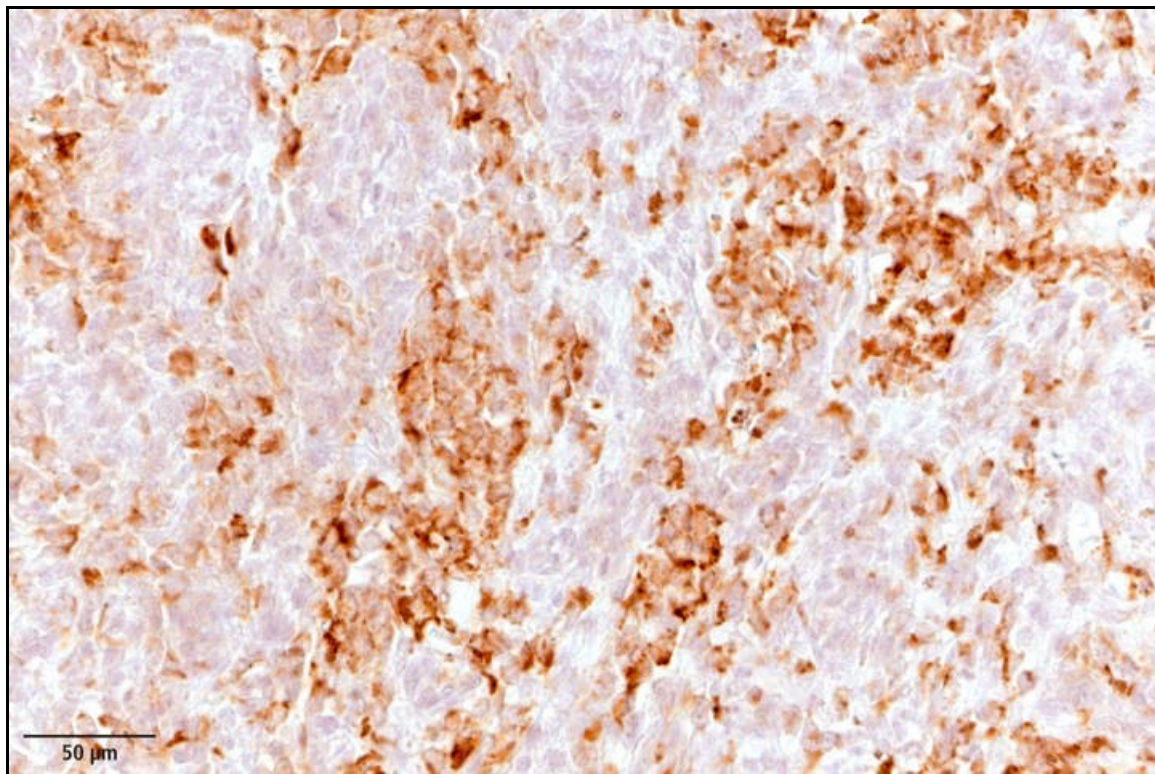
gierten, zeigten ebenfalls eine positive Reaktion, auch wenn der Tumor negativ war. Diese Reaktion war als Indiz dafür zu werten, dass die immunhistochemische Methode erfolgreich war.

**Tab. 13:** Immunhistochemie mit MelanA an insgesamt 20 Tumoren mit der Differentialdiagnose „amelanotisches Melanom“, PROTOKOLL G

<b>Tumor</b>	<b>Reaktionsgrad</b>	<b>Reaktionsmuster</b>	<b>Geschätzte Reaktionsfläche in %</b>
E 636/01	negativ		
E 1374/02	hochgradig positiv	zytoplasmatisch und fokal	85%
E 2269/00	negativ		
E 2438/97	negativ		
E 1256/93	negativ		
E 948/97	negativ		
E 2171/97	hochgradig positiv	zytoplasmatisch und fokal	30%
E 2293/96	hochgradig positiv	zytoplasmatisch und fokal	75%
E 3444/92	negativ		
E 3383/99	negativ		
E 7/96	negativ		
E 2138/96	negativ		
E 2137/09	hochgradig positiv	zytoplasmatisch und fokal	30%
E 1769/96	hochgradig positiv	v.a. zytoplasmatische Reaktion	90%
E 3501/92	negativ		
E 1964/08	hochgradig positiv	v.a. fokale Reaktion	50%
E 1753/96	mittelgradig positiv	v.a. fokale Reaktion	10%
E 1120/92	mittelgradig positiv	v.a. fokale Reaktion	10%
E 2998/98	negativ		
E 1733/09	hochgradig positiv	zytoplasmatische und fokal	80%



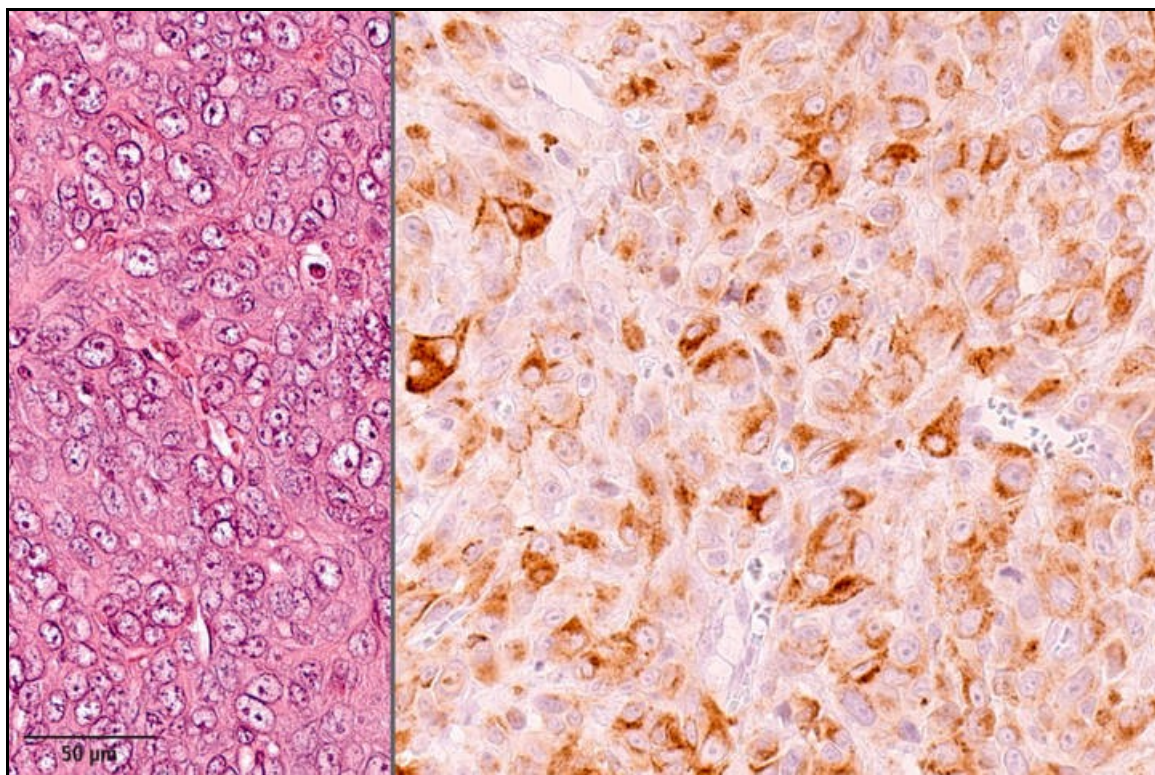
**Abb. 26:** Präparat E 1753/96. Fokale immunhistochemische Reaktion von MelanA in kaninen amelanotischen melanozytären Tumorzellen, PROTOKOLL G.



**Abb. 27:** Präparat E 1021/97. Zytoplasmatische Reaktion eines kaninen amelanotischen Melanoms mit dem Primärantikörper MelanA und dem PROTOKOLL G.

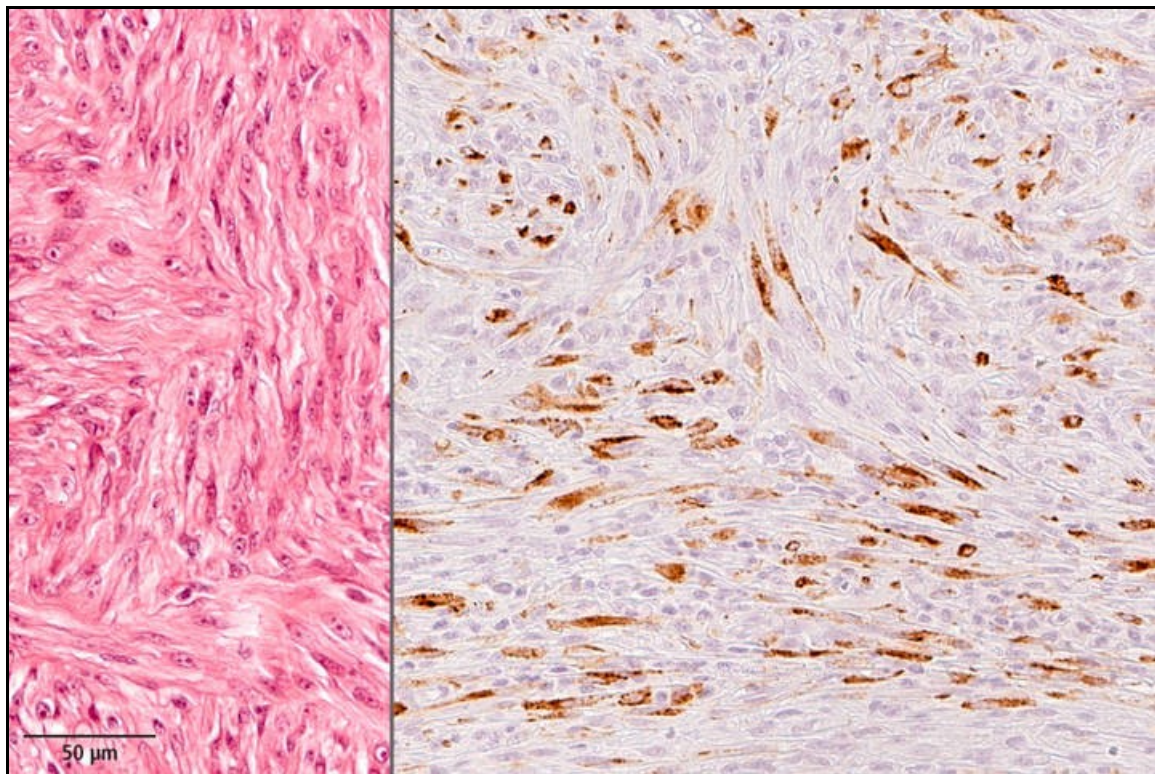


Die Abbildungen 28, 29 und 30 zeigen kanine amelanotische Melanome mit unterschiedlicher Zellmorphologie. Außerdem sind die immunhistochemischen Reaktionsmuster mit MelanA, PROTOKOLL G zu erkennen. Die Abbildungen 28 und 30 stellen die überwiegend zytoplasmatische immunhistochemische Reaktion dar. Währenddessen Abbildung 29 zytoplasmatische und fokale Reaktionen erkennen lässt.



**Abb. 28:** Linke Seite, Präparat E 1374/02: H.E.-Schnitt eines amelanotischen Melanoms, polymorphes Zellbild.

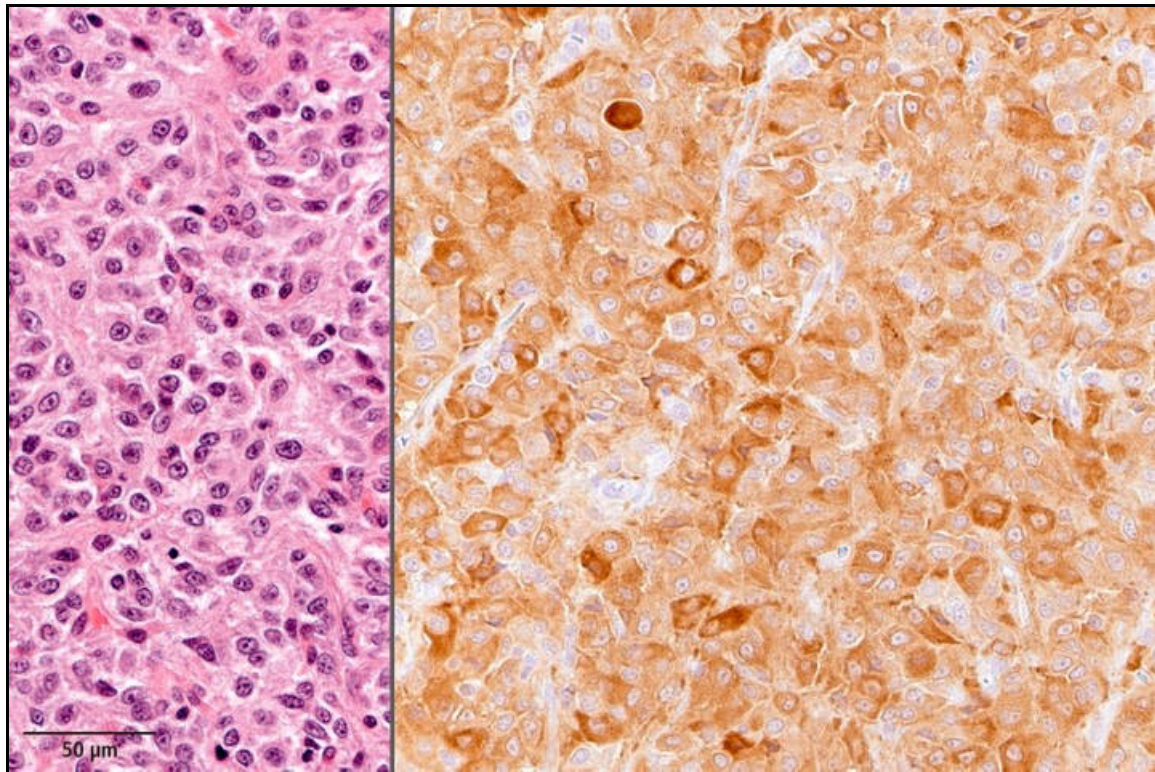
Rechte Seite, Präparat E 1374/02: mittelgradige und auch z.T. hochgradige positive immunhistochemische Reaktion der Tumorzellen mit MelanA, PROTOKOLL G. Es sind allerdings auch negative Tumorzellen zusehen. Die Reaktion ist überwiegend zytoplasmatisch.



**Abb. 29:** Linke Seite, Präparat E 2171/97: H.E.-Schnitt eines amelanotischen Melanoms, spindenzellige Zellmorphologie.

Rechte Seite, Präparat E 2171/97: mittelgradige und vereinzelt hochgradige positive Reaktion der Tumorzellen mit MelanA, PROTOKOLL G. Eine zytoplasmatische und fokale Reaktion ist zu erkennen.





**Abb. 30:** Linke Seite, Präparat E 1769/96: H.E.-Schnitt, amelanotisches Melanom vom Hund, lokalisiert in der Maulhöhle, mit rundzelliger Zellmorphologie.

Rechte Seite, Präparat E 1769/96: immunhistochemische Reaktion mit MelanA, PROTOKOLL G überwiegend geringgradiger zytoplasmatische Färbung der Tumorzellen, mit vereinzelt mittelgradig reagierenden Tumorzellen.

#### 4.2.1 Negativkontrollen mit MelanA

Der Primärantikörper wurde wiederum durch Normalserum ersetzt. Alle Negativkontrollen zeigten keine Reaktion.

### 4.3 Immunhistochemie mit S100

Das PROTOKOLL H wurde mit der Antikörperverdünnungsreihe von 1:300, 1:400, 1:600 und 1:900 an drei Melanomen mit einem amelanotischen Teilbereich getestet. Die weiteren Versuche wurden mit einer Verdünnung von 1:600

durchgeführt. Die Antigen-Antikörper Reaktion in den Tumorzellen war noch gut zu erkennen. Allerdings ließen sich geringgradige unspezifische Hintergrundreaktionen im Epithel und z.T. im Gefäßendothel nicht vermeiden.

Anschließend erfolgte die Immunhistochemie mit dem PROTOKOLL H an den differentialdiagnostisch relevanten Tumoren, um mögliche Kreuzreaktionen ausschließen zu können. Einer der drei Mastzellentumore, zwei von drei Plattenepithelkarzinomen, einer von drei Ameloblastomen, zwei von drei Fibrosarkomen und alle drei Lymphome zeigten eine positive Reaktion des Tumorbereiches. Auch waren unspezifische Hintergrundfärbungen in Endothelzellen, Epithelzellen und der Speicheldrüse zu erkennen.

Aufgrund dieser unspezifischen Reaktion wurde noch ein anderes Protokoll (PROTOKOLL I) getestet. Die Tumorzellen der untersuchten drei Melanome, jeweils mit einem amelanotischen Teilbereich reagierten geringgradig bis mittelgradig positiv. Allerdings war die Reaktion verwaschen und ungleichmäßig. Unspezifische Reaktionen äußerten sich nur in einer sehr dezenten Färbung des Epithels. Anschließend wurden die differentialdiagnostisch relevanten Tumorarten immunhistochemisch dem PROTOKOLL I untersucht. Zwei von drei Mastzellentumoren, drei von drei Plattenepithelkarzinomen, eins von drei Lymphomen, alle drei Fibrosarkome und zwei von drei Ameloblastome zeigten eine positive Reaktion der Tumorzellen.

Aufgrund der unspezifischen Reaktionen wurden keine weiteren Versuche mit S100 unternommen.

#### 4.3.1      Negativkontrollen mit S100

Der Primärantikörper wurde durch Normalserum ersetzt. Alle Negativkontrollen waren negativ.

#### **4.4 Abschließende Beurteilung der Immunhistochemie**

Insgesamt wurden drei unterschiedliche Primärantikörper (HMB45, MelanA und S100) mit Hilfe verschiedener immunhistochemischer Protokolle untersucht. Unter Verwendung der Avidin-Biotin-Komplex Methode mit Mikrowellenvorbehandlung und dem monoklonalen Maus anti-human MelanA Antikörper war es möglich, in kaninen amelanotischen melanozytären Tumorzellen eine spezifische Antigen-Antikörper Reaktion zu erzielen. Das PROTOKOLL G ist gemäß der vorliegenden Arbeit eine sensitive und spezifische Methode um sowohl pigmentierte als auch amelanotische melanozytäre Tumorzellen zu identifizieren. Sowohl die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Protokolle mit dem monoklonalen Maus anti-human Melanosom Antikörper, Klon HMB45 als auch die getesteten Protokolle mit dem polyklonalen Kaninchen anti-S100 Antikörper erwiesen sich aufgrund der unspezifischen Kreuzreaktionen in nicht melanozytären Tumorzellen als ungeeignet, um kanine amelanotische Melanome sicher diagnostizieren zu können.

#### **4.5 Elektronenmikroskopie**

##### **4.5.1 Beurteilung der Melanome, mit einem amelanotischen Teilbereich**

###### **4.5.1.1 Präparat E 579/09**

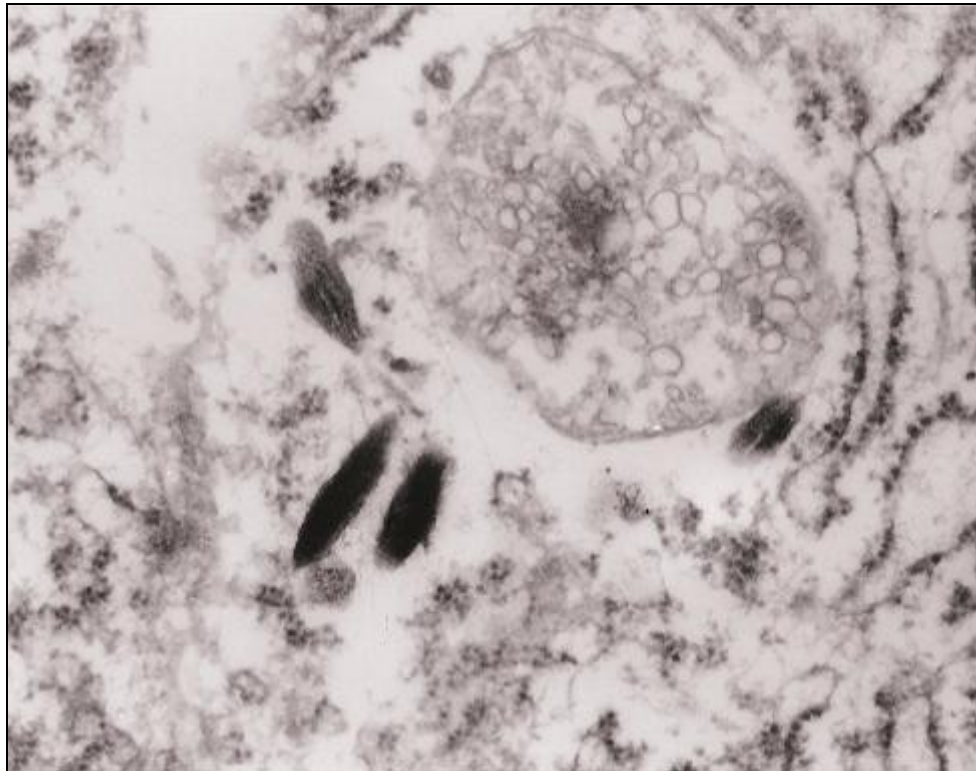
Dieser Tumor weist hauptsächlich Melanosomen III auf, aber es sind auch Melanosomen II zu erkennen (s. Abb. 32). Compound Melanosomen sind ebenfalls darzustellen. Die Tumorzellen sind von rundlicher bis spindelförmiger Morphologie mit einem rundlichen Zellkern. Zellverbindungen sind nicht darstellbar.

###### **4.5.1.2 Präparat E 1739/09**

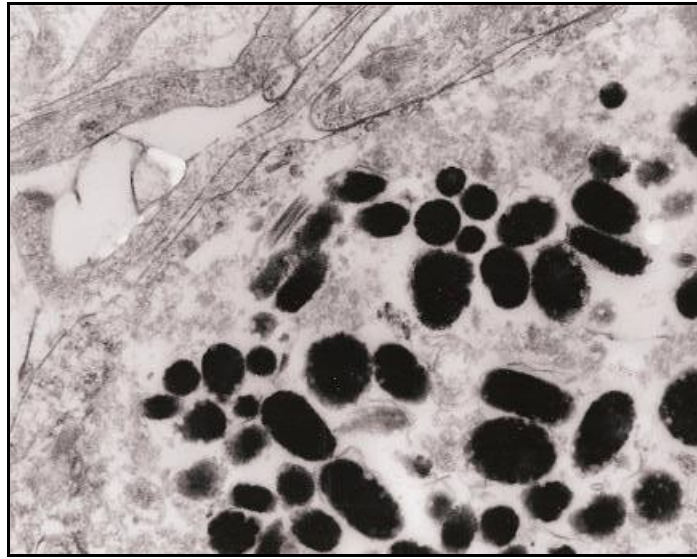
Die Tumorzellen haben eine rundliche bis spindelförmige Zellmorphologie. Es sind keine Zellverbindungen oder Basalmembranen darstellbar. Die Zellkerne



sind rundlich bis oval und euchromatisch. Das mit Ribosomen besetzte endoplasmatische Retikulum ist mäßig entwickelt. Mitochondrien sind aufzufinden. Einzelne Melanosomen unterschiedlicher Entwicklungsstadien (MS II und MS III) sind darzustellen (s. Abb. 31).



**Abb. 31:** Das Melanosom II ist an seiner typischen Streifung zu erkennen. Auch Melanosomen III sind zu sehen. Vergrößerung 68000. Präparat E 1739/09



**Abb. 32:** Das Melanosom II ist an seiner typischen Streifung zu erkennen. Melanosomen III sind ebenfalls zu sehen. Vergrößerung 46100. Präparat E 579/09.

#### 4.5.2 Beurteilung der rundzelligen Neoplasie (E 2137/09)

Es handelt sich um mittelgroße Tumorzellen. Es sind weder Zellverbindungen noch Basalmembranen erkennbar. Die Zellkerne sind rundlich bis oval und euchromatisch. Es sind wenige Mitochondrien aufzufinden. Das mit Ribosomen besetzte endoplasmatische Retikulum ist nur wenig entwickelt. Auch der Golgi-Apparat ist klein. Es sind elektronenmikroskopisch keine Melanosomen darstellbar, obwohl dieser Tumor hochgradig positiv mit MelanA (s. 4.2) reagiert hat.

## **5. Diskussion**

Die vorliegende Arbeit hatte das Ziel, amelanotische Melanome in der Maulhöhle des Hundes mit Hilfe der Immunhistochemie und der Elektronenmikroskopie zu diagnostizieren. Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchungen wurden die Antikörper HMB45 (DAKO, M0634), MelanA (DAKO, M7196) und S100 (DAKO, Z0311) verwendet. Kombinationen von wenig spezifischen, dafür aber sensitiven Antikörper (u.a. S100, Vimentin) mit spezifischen, aber wenig sensitiven Antikörper (u.a. MelanA, HMB45) werden in der Humanmedizin empfohlen. Der unspezifischere Antikörper gibt eine allgemeine Übersicht über die zu beurteilende Läsion, während die spezifischeren Marker, den melanozytären Ursprung der Tumorzellen darstellen sollen (DE WIT et al. 2004). Auch in dieser Arbeit wurde nach diesem Prinzip verfahren.

### **5.1 Immunhistochemie**

#### **5.1.1 HMB45**

Verschiedene Arbeiten haben gezeigt, dass eine Reaktion von HMB45 mit kaninen melanozytären Tumorzellen nicht feststellbar ist, wenn keine Vorbehandlung, eine Hitzevorbehandlung oder andere Arten der Vorbehandlung erfolgen (SULAIMON et al. 2002, RAMOS-VARA et al. 2000, BERRINGTON et al. 1994). Diese Auffassung wurde in der vorliegenden Arbeit bestätigt. SMEDLEY und Mitarbeiter berichten, dass nur die Studie von SULAIMON und Mitarbeitern (SULAIMON et al. 2002) HMB45 als einen sensitiven und spezifischen Marker für die Melanomdiagnostik beim Hund bezeichnet (SMEDLEY et al. 2011). Bei SULAIMON und Mitarbeitern führte erst die Verwendung der Avidin-Biotin-Komplex Methode in Kombination mit der Mikrowellenvorbehandlung und dem Bleichen zu einer positiven Reaktion in den ausgewählten Melanomen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde mit die-

ser Vorbehandlung eine Antigen-Antikörper Reaktion in allen 13 Melanomen erzielt. Allerdings waren die Präparate durch die Bleichung und die Mikrowellenvorbehandlung oft z.T. stark lädiert. Auch die Inkubation des Primärantikörpers von 18 Stunden bei Raumtemperatur führte manchmal zum Austrocknen der Präparate, so dass die Immunhistochemie wiederholt werden musste, bis ein interpretierfähiges Ergebnis erzielt werden konnte. Das PROTOLL F dieser Arbeit baut auf dem PROTOKOLL SULAIMON und Mitarbeiter (2002) auf. Zum Vergleich beider Protokolle dient folgende Tabelle 14:

**Tab. 14:** Vergleich des PROTOKOLLS SULAIMON und Mitarbeiter (2002) mit dem PROTOKOLL F. Die unterstrichenen Bereiche deuten auf Unterschiede zwischen beiden Protokollen hin.

<b>PROTOKOLL SULAIMON et al. 2002: Biotin-Streptavidin-Immunperoxidasetechnik, mit Mikrowelle und Bleichen als Vorbehandlung und 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid als Chromogen</b>	<b>PROTOKOLL F: Avidin-Biotin-Komplex Methode mit HMB45, mit Mikrowelle und Bleichen als Vorbehandlung und 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid als Chromogen</b>
Schnitte entparaffinierten mit Xylol	20 Min. entparaffinierten in Xylol
absteigende Alkoholreihe	mehrere Sekunden spülen in absteigender Alkoholreihe mehrere Sekunden spülen in Aqua dest.
Blockieren der endogenen Peroxidase: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3%ig in Methanol für 30 Min., bei Raumtemperatur	Blockieren der endogenen Peroxidase: H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 3 %ig in Methanol für 30 Min., bei Raumtemperatur
5 Min. spülen in TBS	5 Min. spülen in TBS
Mikrowelle (800 Watt): <u>Level 4 für 10 Min. in Citratpuffer pH 6,4</u>	Mikrowelle (800 Watt): 2 x 10 Min. in Citratpuffer pH 6,0
Schnitte abkühlen lassen im Citratpuffer für <u>30 Min.</u> bei Raumtemperatur	Schnitte abkühlen lassen im Citratpuffer für 20 Min. bei Raumtemperatur
	5 Min. spülen in TBS
Bleichen: Schnitte in 0,25%iges Kaliumpermanganat geben, 30 Min., bei Raumtemperatur	Bleichen: Schnitte in 0,25%iges Kaliumpermanganat geben, 30 Min., bei Raumtemperatur
spülen unter laufendem Wasser	5 Min. spülen unter laufendem Wasser
Schnitte in 5%ige Oxalsäure geben für mindestens <u>2 bis 5'</u> oder bis der Schnitt farblos wird	Schnitte in 5%ige Oxalsäure geben für 1 Min.
TBS Spülung	5 Min. spülen in TBS

<u>Biotin-Streptavidin Immunperoxidase Technik:</u>	Avidin-Biotin-Komplex Methode:
<u>Universal blocking reagent (Power Block, BioGenex), 10 Min., Raumtemperatur</u>	Normalserum von der Ziege, Verdünnung 1:10, für 30 Min., bei Raumtemperatur
<u>TBS Spülung</u>	
Primärantikörper: <u>monoklonaler Maus anti-human Melanosom Antikörper, Klon HMB-45 (Signet Laboratories, Dedham, MA, USA), 1:10, in PBS mit carrier protein in 0,9% Natriumazid (BioGenex), 18 h, bei Raumtemperatur</u>	Primärantikörper: monoklonaler Maus anti-human Melanosom Antikörper, Klon HMB45 (DAKO, Code M0634) 18 h, Verdünnung 1:10, bei Raumtemperatur
<u>3 Min.</u> spülen in TBS	2 x 5 Min. spülen in TBS
Sekundärantikörper: ( <u>commercially available labelling kit, BioGenex</u> ), biotinylierter Ziege anti-Maus Immunglobulin Antikörper, 30 Min., bei Raumtemperatur	Sekundärantikörper: biotinylierter Ziege anti-Maus Immunglobulin Antikörper (DAKO E0433), 30 Min. bei Raumtemperatur, Verdünnung 1:200, Zugabe von 5%igem Hundeserum zur Reduktion von unspezifischen Hintergrundreaktionen
	5 Min. spülen in TBS
Nachweisreagenz: <u>Peroxidase konjugierter Streptavidin Super Sensitive label (BioGenex)</u>	Nachweisreagenz: Avidin-Biotin-Komplex (Elite ABC-Kit, Vector Laboratories, Vectastain®), Verdünnung 1:100, bei Raumtemperatur
	2 x 5 Min. spülen in TBS
<u>5 Min.</u> 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid	10 Min. 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid
	5 Min. spülen unter laufendem Wasser
gegengefärbt mit <u>Mayers Hämatoxylin</u>	3 Min. Mayers-Hämalaun
	5 Min. spülen unter laufendem Wasser
entwässern und eingedeckeln	spülen in Aqua dest., Entwässerung in aufsteigender Alkoholreihe, Xylol, eindeckeln mit Histokitt

SULAIMON und Mitarbeiter erzielten eine positive Reaktion bei 22 von insge-

samt 25 kaninen Melanomen (SULAIMON et al. 2002). Außerdem testeten die Autoren 16 nicht melanozytäre Tumore. Einer von drei Plasmazytomen zeigte eine positive Reaktion. Drei Fibrosarkome und ein Plattenepithelkarzinom wiesen eine leichte Hintergrundfärbung auf. In der vorliegenden Arbeit wurde mit dem PROTOKOLL F eine positive Reaktion in allen getesteten Melanomen erzielt. Allerdings zeigte sich bei der Untersuchung von nicht-melanozytären Tumoren, dass die Reaktion äußerst unspezifisch war, da jeder der getesteten Neoplasien eine unspezifische Reaktion aufwies. Einzig das Bindegewebe blieb reaktionslos. Unterstrichene Bereiche verdeutlichen Abweichungen des Protokolles, welches in dieser Arbeit verwendet wurde und des Protokolles von SULAIMON und Mitarbeiter (2002). Bei der Mikrowellenvorbehandlung wurde auf die schon etablierte Technik der Hitzebehandlung des Instituts für Tierpathologie zurückgegriffen. Die Zeit für das Abkühlen der Schnitte nach der Mikrowellenbehandlung wurde ebenfalls vom Institut übernommen. Verschiedene Einwirkzeiten der 5%igen Oxalsäure wurden getestet. Die hier gewählte Einwirkzeit von einer Minute wurde erarbeitet und somit eine Abweichung vom Originalprotokoll in Kauf genommen. Einen Unterschied gibt es in der verwendeten Methode der Immunhistochemie. Hier wurde die Avidin-Biotin-Komplex Methode verwendet, während bei SULAIMON und Mitarbeitern auf die Biotin-Streptavidin-Methode zurückgegriffen wurde (2002). Beide Methoden zählen zu den indirekten Systemen und sind vom Prinzip her ähnlich. Allerdings ist bekannt, dass es durch unspezifische Bindungen von Avidin an Lektine und auch durch unspezifische elektrostatische Bindungen zur Hintergrundfärbung kommen kann. Das wird durch die Verwendung von Streptavidin vermieden, weil es eine geringe elektrostatische Interaktion mit Gewebselementen aufweist und auch keine Bindung mit Lektinen eingeht (RAMOS-VARA 2005). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die unspezifischen Reaktionen sich auf diesen Unterschied zurückführen lassen. Das universal blocking reagent, welches

bei SULAIMON und Mitarbeitern verwendet wurde, konnte trotz Recherche bei BioGenex nicht gefunden werden (2002). Es wird angenommen, dass es unspezifische Hintergrundreaktionen unterdrücken soll. In der vorliegenden Arbeit wurde Normalserum von der Ziege verwendet, um denselben Effekt zu erzielen. Das Spülen danach unterblieb. Die verwendeten Antikörper sind identisch (HMB45, Isotyp IgG<sub>1</sub>). Sie wurden aber von verschiedenen Firmen bezogen. SULAIMON und Mitarbeiter verwendeten ein kommerzielles Kit als Sekundärantikörper und als Nachweisreagenz. In der vorliegenden Arbeit wurde, passend zur gewählten Methode, ein biotinylierter Ziege anti-Maus Immunglobulin Antikörper verwendet. Das Hundeserum diente wiederum dem Zweck, unspezifische Hintergrundreaktionen zu reduzieren. Das Nachweisreagenz ergibt sich aus der verwendeten Methode. Die Färbedauer des 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorids von 10 Minuten wurde ebenfalls erarbeitet. In der vorliegenden Arbeit wurde bestätigt, dass, wie bei SULAIMON und Mitarbeitern, die Bleichung mit Kaliumpermanganat und Oxalsäure eine Aufhellung der Pigmentgranula zur Folge hat. Allerdings kam es in der vorliegenden Arbeit, im Gegensatz zu SULAIMON und Mitarbeitern, durch den Bleichungsschritt zu einer unspezifischen Kreuzreaktion. Diese äußerte sich in einer deutlichen falsch positiven Anfärbung von Endothel, Epithel, Muskelzellen und nicht-melanozytären Tumoren. Außerdem reagierten nach der Bleichung pigmentierte Melanome auch mit anderen Antikörpern (CD20, CD117 und Zytokeratin) positiv. Eine Demaskierung eines speziellen melanozytären Antigens, welches dann durch HMB45 erkannt wird, ist durch die Bleichung und die Erhitzung in der Mikrowelle somit in der vorliegenden Arbeit nicht gegeben. Negativkontrollen wurden stets mitgeführt, die keine Reaktion zeigten. Durch diesen Schritt wurde ausgeschlossen, dass die unspezifische Reaktion eine Reaktion des Sekundärantikörpers mit Gewebeteilen darstellt. Obwohl sich



das PROTOKOLL F soweit wie möglich an das Originalprotokoll von SULAIMON und Mitarbeitern orientiert, war es nicht möglich, vergleichbare Ergebnisse in den Tumoren zu erzielen. Das PROTOKOLL F ist aufgrund seiner geringen Spezifität für die Diagnose von kaninen amelanotischen Melanomen nicht geeignet. Von einer weiteren Verwendung von HMB45 (DAKO M0634) zur kaninen Melanomdiagnostik wurde abgesehen.

#### 5.1.2 MelanA

Insgesamt ließen sich 13 kanine Melanome mit einem amelanotischen Teilbereich positiv anfärben. Somit war die Sensitivität des Protokolls gewährleistet. Eine Unterscheidung zwischen dem Präzipitat von 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid und den Melaningranula war möglich, da sich das Präzipitat der immunhistochemischen Reaktion heller darstellte als die Melaningranula. Auch in der Literatur wird MelanA als ein sensibler Marker für die kanine Melanomdiagnostik beschrieben (RAMOS-VARA und MILLER 2011, SMEDLEY et al. 2011, CANGUL et al. 2001, KOENIG et al. 2001, RAMOS-VARA et al. 2000). Die Spezifität des Antikörpers wurde durch das Testen von differentialdiagnostisch relevanten Tumorarten (Fibrosarkom, Plattenepithelkarzinom, Mastzellentumor, Lymphom und Ameloblastom) überprüft. Die Wahl fiel auf diese Tumorarten, weil das Plattenepithelkarzinom, das Fibrosarkom (TODOROFF und BRODEY 1979, BRODEY 1960), das maligne Lymphom und sehr selten der Mastzellentumor ebenfalls in der Maulhöhle gefunden werden können (BRODEY 1960). Außerdem sollten in der immunhistochemischen Untersuchung verschiedene embryologische Histiogenesen berücksichtigt werden. Melanozytäre Neoplasien sind neuroektodermaler Abstammung, Fibrosarkome, Ameloblastome und Lymphome sind mesenchymalen Ursprungs. Das Plattenepithelkarzinom und das Ameloblastom zählen zu den epithelialen Tumoren. MelanA reagierte in der vorliegenden Arbeit nicht mit Tumoren aus der mesen-

chymalen Linie. Als einziger von den nicht melanozytären Tumoren reagierte einer von drei Plattenepithelkarzinomen. Allerdings handelte es sich um eine geringgradige unspezifische Hintergrundreaktion, die von einer positiven Antigen-Antikörper Reaktion, wie sie in den Melanomen zu sehen war, zu unterscheiden ist. Auch war im reagierenden Plattenepithelkarzinom keine fokale Reaktion erkennbar. Somit war auch die Spezifität der Antigen-Antikörper Reaktion gewährleistet. RAMOS-VARA und Mitarbeiter berichten von positiven Reaktionen in folgenden Zellen normalen kaninen Gewebes: Epithel der interlobulären und intralobulären Kanäle der Speicheldrüse, intraepidermale Melanozyten der Haut und selten des Haarbulbus, Azinuszellen der Prostata, Urethraepithel, Epithelzellen des Augenlides, respiratorisches und alveoläres Epithel, Gangepithel des Pankreas, Epithelzellen der Nebennierenrinde (v.a. Zona fasciculata und reticularis), Leydigzellen des Hodens (RAMOS-VARA et al. 2000). Diese Ergebnisse stimmen zum größten Teil auch mit der vorliegenden Arbeit überein. Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit Kreuzreaktionen mit dem Kolloid der Schilddrüse, den Follikelepithelzellen, dem Endometrium, der Granulosaluteinzellen, den Alveolarmakrophagen und den Hepatozyten festgestellt. Diese falsch positiven Gewebe zeigen bei der molekularen Analyse keine Expression von MelanA-mRNA. Die immunreaktiven Epitope, welche von MelanA erkannt werden, stellen in diesen Geweben wahrscheinlich eine immunologische Kreuzreaktion dar (BUSAM et al. 1998, JUNGBLUTH et al. 1998). Auch die Kreuzreaktionen von MelanA mit Nierenrindenadenomen, Nierenrindenkarzinomen (GHORAB et al. 2003, BUSAM et al. 1998), Leydigzellentumoren und Sertoli-Leydigzellentumoren des Ovars sind wohlbekannt und können für diagnostische Zwecke verwendet werden (BUSAM et al. 1998).

In neun von 20 Neoplasien, mit der Differentialdiagnose „amelanotisches Melanom“, konnte der melanozytäre Ursprung der Tumorzellen mit MelanA nachge-

wiesen werden. In der vorliegenden Arbeit liegt die Sensivität von MelanA bei 100%, da alle 13 Melanome mit einem amelanotischen Teilbereich eine Reaktion mit MelanA zeigten. Die berichtete Spezifität von MelanA liegt bei 47,6% (CHOI und KUSEWITT 2003), 62,1% (KOENIG et al. 2001), 71,4% (CANGUL et al. 2001), 81,6% (SMEDLEY et al. 2011) und 91,5% (RAMOS-VARA et al. 2000). Das macht eine durchschnittliche Spezifität von rund 75%. Es ist deshalb davon auszugehen, dass nicht alle amelanotischen Melanome mit MelanA erfasst wurden. Es ist bekannt, dass Tumorzellen ihre relevanten Epitope verlieren können und somit falsch negativ reagieren (ORCHARD 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde festgestellt, dass MelanA mit allen melanozytären Tumorzelltypen reagiert. Allerdings ließen sich weniger spindelizellige Zellen anfärben als polygonale oder rundzellige Zelltypen. Dies wurde auch schon von RAMOS-VARA und Mitarbeitern berichtet (RAMOS-VARA et al. 2000). In der vorliegenden Arbeit hat sich MelanA als ein sensibler und spezifischer Marker in der kaninen Melanomdiagnostik gezeigt. Allerdings ist es nicht möglich, nur mit MelanA eine 100% Sensitivität zu erzielen. Um eine möglichst hohe Sensitivität zu erreichen, müssen mehrere Antikörper kombiniert werden. Auch in der Literatur wird beschrieben, dass eine Diagnose eines kaninen Melanoms nur durch eine Kombination von verschiedenen Antikörper möglich ist (RAMOS-VARA und MILLER 2011, SMEDLEY et al. 2011).

### 5.1.3 S100

Es wurde mit dem Antikörper S100 ein weniger spezifischer Marker getestet, um mögliche falsch negative amelanotische Melanome in der Versuchsgruppe identifizieren zu können. Die Sensitivität von S100 zur Diagnose von kaninen Melanomen liegt bei 76-100% (s. 2.6.9.2). In der vorliegenden Arbeit reagierte

S100 mit den zu Beginn ausgewählten drei kaninen Melanomen deutlich. Allerdings zeigte S100 auch mit 12 der insgesamt 15 differentialdiagnostisch relevanten Tumoren der Maulhöhle eine Reaktion. Dies ergibt eine Spezifität von 20%. Auch SMEDLEY und Mitarbeiter berichten von einer Spezifität von 20% (SMEDLEY et al. 2011). Diese Spezifität ist zu gering, um S100 sinnvoll in der kaninen Melanomdiagnostik einsetzen zu können, da die Anzahl von falsch positiven Tumoren zu hoch wäre. Weitere weniger spezifische Antikörper, auf die zurückgegriffen werden kann, sind Keratin und Vimentin. Keratin gilt als Marker von epithelialen Zellen, der mit Melanomen keine Reaktion zeigt. Vimentin reagiert mit mesenchymalen Zellen und Melanomen und weist keine Reaktion mit epithelialen Tumoren auf. Keratin und Vimentin weisen allerdings ebenfalls eine geringe Spezifität auf, so dass eine Reaktion eines Tumors mit den genannten Antikörpern nur einen Überblick über die zu beurteilende Läsion geben kann (AZUMI und BATTIFORA 1987). Auf die weitere immunhistochemische Untersuchung der 12 Tumore, die nicht mit MelanA reagiert hatten, wurde verzichtet, da dies nicht Ziel der vorliegenden Arbeit war.

## **5.2 Elektronenmikroskopische Untersuchung**

Es wurden zwei pigmentierte Melanome und eine rundzellige Neoplasie elektronenmikroskopisch untersucht. Bei den zwei pigmentierten Melanomen wurden zweifelsfrei Melanosomen II und III nachgewiesen und somit auch elektronenmikroskopisch der melanozytäre Charakter der Tumorzellen bewiesen. Allerdings konnte der elektronenmikroskopische Nachweis von Melanosomen bei der rundzelligen Neoplasie E 2137/09 nicht erbracht werden, obwohl sich immunhistochemisch die Tumorzellen mit MelanA positiv färben ließen. Immunhistochemisch ließ sich ein amelanotisches Melanom diagnostizieren, elektronenmikroskopisch war dieses nicht möglich. Möglicher-

---

weise wurden durch die Formalinfixierung die Melanosomen zerstört, so dass sie elektronenmikroskopisch nicht mehr als solche erkennbar waren. Allerdings wurde von SMITH und Mitarbeitern (2002) berichtet, dass Melanosomen eine Fixierung mit Formalin überstehen. Weiterhin wäre es möglich, dass an den für die Elektronenmikroskopie gewählten Lokalisationen keine Melanosomen vorhanden waren. Allerdings erfolgte die Probeentnahme an unterschiedlichen Lokalisationen, um dieses Problem möglichst auszuschließen. Letztendlich ist allerdings die in dieser Arbeit vorliegende Probenanzahl zu klein, um Rückschlüsse hinsichtlich des diagnostischen Nutzens der Elektronenmikroskopie ziehen zu können.



## 6. ZUSAMMENFASSUNG

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe der Immunhistochemie und der Elektronenmikroskopie amelanotische Melanome in der Maulhöhle des Hundes zu diagnostizieren. Im Rahmen der immunhistochemischen Untersuchung wurden die Antikörper HMB45, MelanA und S100 verwendet. S100 sollte als sensitiver, dafür aber wenig spezifischer Antikörper, einen allgemeinen Überblick über die zu beurteilende Läsion geben. MelanA und HMB4 sollten als spezifische Antikörper den melanozytären Ursprung der Tumorzellen nachweisen. Es wurden verschiedene immunhistochemische Protokolle an kaninen oralen Melanomen, differentialdiagnostisch relevanten Neoplasien und normalem kaninen Gewebe getestet, um die Sensitivität und die Spezifität der jeweiligen Antikörpers festzustellen. HMB45 zeigte in der vorliegenden Arbeit nur nach der Demaskierung des Antigens nach SULAIMON und Mitarbeitern (2002) eine Antigen-Antikörper Reaktion in kaninen melanozytären Tumorzellen. Allerdings war in der vorliegenden Arbeit die Spezifität des Antikörpers nach der Bleichung nicht gegeben, so dass mit diesem Antikörper nicht weiter gearbeitet wurde. S100 zeigte in der vorliegenden Arbeit bei zwei unterschiedlichen immunhistochemischen Protokollen eine hohe Sensitivität für kanine Melanome. Aber die Spezifität des Antikörpers von 20% war nur gering. Auch mit diesem Antikörper wurde nicht weiter gearbeitet. MelanA erwies sich in der vorliegenden Arbeit als ein sensitiver und spezifischer Marker von kaninen Melanomen. Deshalb wurden 20 kanine orale Tumore mit der Differentialdiagnose „amelanotisches Melanom“ mit dem erarbeiteten immunhistochemischen Protokoll mit MelanA untersucht. Bei neun Tumoren gelang es, den melanozytären Ursprung der Tumorzellen nachzuweisen. Ziel der Elektronenmikroskopie war es, Melanosomen frühen Stadiums zu identifizieren, um den melanozytären Ursprung der Tumorzellen nachzuwei-

sen. Es wurden zwei Melanome mit einem amelanotischen Teilbereich untersucht. Hier gelang es mit Hilfe des Elektronenmikroskops Melanosomen II und III darzustellen und somit die Neoplasie als Melanom einzustufen.



## 7. SUMMARY

### **Immunohistochemical diagnosis of canine oral amelanotic melanomas.**

The purpose of the present study was to diagnose canine oral amelanotic melanoma with the use of immunohistochemical and electron microscopy methods. For the immunohistochemical techniques the following three antibodies were chosen and tested: a mouse monoclonal antibody against melanosomes (DAKO M0634, clone HMB45), a mouse monoclonal antibody against MelanA (DAKO M7196, clone A103) and a rabbit polyclonal antibody against S100 (DAKO Z0311, S100). The less specific but highly sensitive marker S100 was chosen to give an overall impression of the lesion. MelanA and HMB45 as specific but less sensitive markers were used to prove the melanocytic origin of the tumours. Different immunohistochemical staining procedures were tested on canine oral melanomas, other neoplasms, which are important differential diagnosis and normal canine tissue, to evaluate the sensitivity and specificity of each antibody. After the antigen retrieval and bleaching steps described according to SULAIMON and co-workers (2002) the antibody HMB45 reacted with canine melanocytic tumor cells. But in this study the specificity after the bleaching steps was very low. Because of this result the work with HMB45 was not continued. The second antibody, which was used in this study, was S100. It showed with two different immunohistochemical techniques a high sensitivity for canine melanomas. But the specificity was low with 20% which was the reason not to continue the study with S100. The third antibody used in this study was MelanA. MelanA demonstrated a high sensitivity and specificity as a marker for canine melanomas. Altogether 20 canine oral neoplasms with the differential diagnosis “amelanotic melanoma” were tested with the immunohistochemical method with MelanA. It was successfully

proved the melanocytic origin by nine tumours. The purpose of the electron microscopy was to identify melanosomes of early stages to prove the melanocytic origin of the tumor cells. Two melanomas with an amelanotic part were examined. It was possible to show with the electron microscopy melanosomes II and III. This proved that these neoplasms were melanomas.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

- ACKERMANN A. B., MAGANA-GARCIA M. (1990): Naming acquired melanocytic nevi. *The American Journal of Dermatopathology* 12(2), 193-209.
- ADLER M. J., WHITE JR. C. R. (1997): Amelanotic malignant melanoma. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery* 16(2), 122-130.
- ANCANS J., TOBIN D. J., HOOGDUIJN M. J., SMIT N. P., WAKAMATSU K., THODY A. J. (2001): Melanosomal pH controls rate of melanogenesis, eumelanin/pheomelanin ratio and melanosome maturation in melanocytes and melanoma cells. *Experimental Cell Research* 268, 26-35.
- ARIEL I. M. (1981): Malignant melanoma of the upper extremities. *J Surg Oncol* 16, 125-143.
- ASPENGREN S., HEDBERG D., WALLIN M. (2006): Studies of pigment transfer between *Xenopus laevis* melanophores and fibroblasts in vitro and in vivo. *Pigment Cell Res* 19, 136-145.
- AZUMI N., BATTIFORA H. (1987): The distribution of vimentin and keratin in epithelial and nonepithelial neoplasms. A comprehensive immunohistochemical study on formalin- and alcohol-fixed tumors. *American Journal of Clinical Pathology* 88(3), 286-296.
- BANERJEE S. S., HARRIS M. (2000): Morphological and immunophenotypic variations in malignant melanoma. *Histopathology* 36, 387-402.

- BASTIAN B. C., OLSHEN A. B., LEBOIT P. E., PINKEL D. (2003):  
Classifying melanocytic tumors based on DNA copy number changes.  
*American Journal of Pathology* 163(5), 1765-1770.
- BERGMAN P. J. (2007): Canine oral melanoma. *Clin Tech Small Anim Pract*  
22, 55-60.
- BERRINGTON A. J., JIMBOW K., HAINES D. M. (1994):  
Immunohistochemical detection of melanoma-associated antigens on  
formalin-fixed, paraffin-embedded canine tumors. *Veterinary*  
*Pathology* 31(4), 455-461.
- BHARTI K., NGUYEN M.-T. T., SKUNTZ S., BERTUZZI S., ARNHEITER  
H. (2006): The other pigment cell: specification and development of  
the pigmented epithelium of the vertebrate eye. *Pigment Cell Research*  
19, 380-395.
- BILLINGHAM R. E., SILVERS W. K. (1960): The melanocytes of mammals.  
*The quarterly review of biology* 35(1), 1-40.
- BISHOP P. W., MENASCE L. P., YATES A. J., WIN N. A., BANERJEE S. S.  
(1993): An immunophenotypic survey of malignant melanomas.  
*Histopathology* 23, 159-
- BOENISCH T. (1989a): Enzyme, eine Einführung. In: Handbuch  
immunchemischer Färbemethoden II. NAISH S. J. (Hrsg.). DAKO  
Corporation, Carpinteria, Kalifornien, USA. S. 18 und 19.
- BOENISCH T. (1989b): Färbemethoden. In: Handbuch immunhistochemischer  
Fräbemethoden II. NAISH S. J. (Hrsg.). DAKO Corporation,  
Carpinteria, Kalifornien, USA. S. 24.

- BOLON B., CALDERWOOD MAYS M B., HALL B. J. (1990): Characteristics of canine melanomas and comparison of histology and DNA ploidy to their biologic behavior. *Vet Pathol* 27, 96-102.
- VAN DEN BOSSCHE K., NAEYAERT J.-M., LAMBERT J. (2006): The quest for the mechanism of melanin transfer. *Traffic* 7, 769-778.
- BOURNE J. A. (1983): Handbuch I der Immunperoxidase-Färbemethoden. S. 7, 11, 12, 13.
- BOYLE J. L., HAUPT H. M., STERN J. B., MULTHAUPT H. A. B. (2002): Tyrosinase expression in malignant melanoma, desmoplastic melanoma, and peripheral nerve tumors: an immunohistochemical study. *Arch Pathol Lab Med* 126, 816-822.
- DE BRAUD F., KHAYAT D., KROON B. B. R., VALDAGNI R., BRUZZI P., CASCINELLI N. (2003): Malignant melanoma. *Critical reviews in Oncology/Hematology* 47, 35-63.
- BRESLOW A. (1970): Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. *Ann Surg* 172,902-908.
- BRITO F. C., KOS L. (2008): Timeline and distribution of melanocyte precursors in the mouse heart. *Pigment Cell and Melanoma Research* 21(4), 464-470.
- BRODEY R. S. (1960): Neoplasms of the mouth and pharynx of the dog. *Am J Vet Res* Sept., 787-812.

- BUSAM K. J., CHEN Y.-T., OLD L. J., STOCKERT E., IVERSEN K. B. A., COPLAN K. A. M., ROSAI J., BARNHILL R. L., JUNGBLUTH A. (1998): Expression of MelanA (MART1) in benign melanocytic nevi and primary cutaneous malignant melanoma. *The American Journal of Surgical pathology* 22(8), 976-982.
- BUSAM K. J., IVERSEN K. B. S., COPLAN K. C. B. S., JUNGBLUTH A. (2001): Analysis of microphthalmia transcription factor expression in normal tissues and tumors, and comparison of its expression with S-100 protein, gp100, and tyrosinase in desmoplastic malignant melanoma. *The American Journal of Surgical Pathology* 25(2), 197-204.
- BUSAM K. J. (2005): Cutaneous desmoplastic melanoma. *Advances in Anatomic Pathology* 12(2),92-102.
- BUSH W. D., GARGUILO J., ZUCCA F. A., ALBERTINI A., ZECCA L., EDWARDS G. S., NEMANICH R. J., SIMON J. D. (2006): The surface oxidation potential of human neuromelanin reveals a spherical architecture with a pheomelanin core and a eumelanin surface. *PNAS* 103(40), 14785-14789.
- CANGUL I. T., VAN GARDEREN E., VAN DER LINDE-SIPMAN J. S., VAN DEN INGH T. S. G. A. M., SCHALKEN J. A. (2001): Canine balloon and signet-ring cell melanomas: a histological and immunohistochemical characterization. *J Comp Pathol* 125, 166-173.

- CERDAN D., REDZINIAK G., BOURGEOIS C. A., MONSIGNY M., KIEDA C. (1992): C32 human melanoma cell endogenous lectins: characterization and implication in vesicle-mediated melanin transfer to keratinocytes. *Exp Cell Res* 203, 164-173.
- CHEN Y.-T., STOCKERT E., JUNGBLUTH A., TSANG A., KEREN A. (1996): Serological analysis of Melan-A (MART-1), a melanocyte-specific protein homogeneously expressed in human melanomas. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(12), 5915-5919.
- CHEN X., CHO D. B., YANG P. C. (2010): Double staining immunohistochemistry. *North Am J Med* 2, 241-245.
- CHOI C., KUSEWITT D. F. (2003): Comparison of tyrosinase-related protein-2, S-100, and MelanA immunoreactivity in canine amelanotic melanomas. *Vet Pathol* 40(6), 713-718.
- CLARK W. H. JR., FROM L., BERNARDINO E. A., MIHM M. C. (1969): The histogenesis and biological behavior of primary human malignant melanomas of the skin. *Cancer Res* 29(3), 705-720.
- CLARK W. H. JR., REIMER R. R., GREENE M., AINSWORTH A. M., MASTRANGELO M. J. (1978): Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. The B-K mole syndrome. *Arch Dermatol* 114(5), 732-738.

- CLEMENTE C., CASCINELLI N., RILKE F. (1980): Monomorphic cellular proliferation of malignant melanomas of the skin as a prognostic morphologic parameter. *Hum Pathol* 11, 299-300.
- COCHRAN A. J., WEN D. R. (1985): S-100 protein as a marker for melanocytic and other tumours. *Pathology* 17, 340-345.
- COULIE P. G., BRICHARD V., VAN PEL A., WÖLFEL T., SCHNEIDER F., TRAVERSARI C., MATTEI S., De PLAEN E., LURQUIN C., SZIKORA J.-P., RENAULD J.-C., BOON T. (1994): A new gene coding for a differentiation antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J Exp Med* 180, 35-42.
- CRIBIER. B. J., SANTINELLI F., GROSSHANS E. (1999): Lack of clinical-pathological correlation in the diagnosis of congenital naevi. *British Journal of Dermatology* 141, 1004-1009.
- DELL'ANGELICA E. C., MULLINS C., CAPLAN S., BONIFACINO J. S. (2000): Lysosome-related organelles. *FASEB J* 14, 1265-1278.
- DELL'ANGELICA E. C. (2003): Melanosome biogenesis: shedding light on the origin of an obscure organelle. *Trends in Cell Biology* 13(10), 503-506.
- DIPPOLD W. G., LLOYD K. O., LI L. T. C., IDEKA H., OETTGEN H. F., OLD L. J. (1980): Cell surface antigens of human malignant melanoma: Definition of six antigenic systems with mouse monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci* 77(10), 6114-6118.



- DIPPOLD W. G., DIENES H. P., KNUTH A., MEYER ZUM BÜSCHENFELDE K. H. (1985): Immunohistochemical localization of ganglioside G<sub>G3</sub> in human malignant melanoma, epithelial tumors, and normal tissues. *Cancer Res* 45(8), 3699-3705.
- DONATO R. (2003): Intracellular and extracellular roles of S100 proteins. *Microscopy Research and Technique* 60, 540-551.
- LE DOUARIN N. M., DUPIN E. (2003): Multipotentiality of the neural crest. *Curr Opin Genet Dev* 13, 529-536.
- ERLANDSON R. A. (1987): Ultrastructural diagnosis of amelanotic malignant melanoma: aberrant melanosomes, myelin figures of lysosomes? *Ultrastructural Pathology* 11, 191-208.
- FERNANDEZ N. J., WEST K. H., JACKSON M. L., KIDNEY B. A. (2005): Immunohistochemical and histochemical stains for differentiating canine cutaneous round cell tumors. *Vet Pathol* 42, 437-445.
- FERNANDO S. S., JOHNSON S., BATE J. (1994): Immunohistochemical analysis of cutaneous malignant melanoma: comparison of S-100 protein, HMB-45 monoclonal antibody and NKI/C3 monoclonal antibody. *Pathology* 26(1), 16-19.
- FETISSOV S. O., BARCZA M. A., MEGUID M. M., OLER A. (1999): Hypophysial and meningeal melanocytes in the Zucker rat. *Pigment Cell Res* 12(5), 323-330.

- FETSCH P. A., CORMIER J., HIJAZI Y. M. (1997): Immunocytochemical detection of MART-1 in fresh and paraffin-embedded malignant melanomas. *Journal of Immunotherapy* 20(1), 60-64.
- FITZPATRICK T. B. (1952): Human melanogenesis. *Arch Dermatol* 65, 379-391.
- FRIEDMAN R. J., FARBER M. J., WARYCHA M. A., PAPATHASIS N., MILLER M. K., HEILMANN E. R. (2009): The „dysplastic“ nevus. *Clinics in Dermatology* 27, 103-115.
- FUKUDA M., KURODA T., MIKOSHIBA K. (2002): Melanophilin, the Missing Link between Rab27 and Myosin Va. *The Journal of Biological Chemistry* 277(14), 12432-12436.
- GARBE C., BÜTTNER P., BERZT J., BURG G., D'HOEDT B., DREPPER H., GUGGENMOOS H., LECHNER W., LIPPOLD A., ORFANOS C. E. et al. (1995a): Primary cutaneous melanoma. Identification of prognostic groups and estimation of individual prognosis for 5093 patients. *Cancer* 75, 2484-2491.
- GARBE C., HAUSCHILD A., VOLKENANDT M., SCHADENDORF D., STOLZ W., REINHOLD U., KORTMANN R.-D., KETTELHACK C., FRERICH B., KEILHOLZ U., DUMMER R., SEBASTIAN G., TILGEN W., SCHULER G., MACKENSEN A., KAUFMANN R. (2005): Deutsche Leitlinie: Malignes Melanom, Vers. 15.

- VAN GASTEL M., BUBACCO L., GROENEN E. J., VIJENBOOM E.,  
CANTERS G. W. (2000): EPR study of the dinuclear active copper  
site of tyrosinase from *Streptomyces antibioticus*. *FEBS Lett* 474(2-3),  
228-232.
- GERAMI P., ZEMBOWICZ A. (2011): Update on fluorescence in situ  
hybridization in melanoma. *Arch Pathol Lab Med* 135, 830-837.
- GHADIALLY F. N: (1985): Diagnostic electron microscopy of tumours.  
Second Edition. S. 5, 106, 107, 112.
- GHORAB Z., JORDA M., GANJEI P., NADJI M. (2003): Melan A (A103) is  
expressed in adrenocortical neoplasms but not in renal cell and  
hepatocellular carcinomas. *Applied Immunohistochemistry and  
Molecular Morphology* 11(4), 330-333.
- GIBSON L. E., GOELLNER J. R. (1988): Amelanotic melanoma: cases studied  
by Fontana stain, S-100 immunostain, and ultrastructural examination.  
*Mayo Clin Proc* 63, 777-782.
- GINN P. E., MANSELL J. E. K. L., RAKICH P. M. (2007): Skin and  
appendages. In: Pathology of domestic animals. MAXIE E. G. (ed.),  
Vol. 1, 5<sup>th</sup> Edition, Elsevier Saunders, Edinburgh. S. 760.
- GOLDGEIER M. H., KLEIN L. E., KLEIN-ANGERER S., MOELLMANN G.,  
NORDLUND J. J. (1984): The distribution of melanocytes in the  
leptomeninges of the human brain. *The Journal Of Investigative  
Dermatology* 82, 235-238.
- GOLDSCHMIDT M. H. (1985): Benign and malignant melanocytic neoplasms  
of domestic animals. *Am J Dermatopathol* 7(Suppl), 203-212.

- GOLDSCHMIDT M. H. (1994): Pigmented lesions of the skin. *Clinics in Dermatology* 12, 507-514.
- GONTIER E., CARIO-ANDRÉ M., LEPREUX S., VERGNES P., BIZIK J., SURLEVE-BAZEILLE J.-E., TAIEB A. (2002): Dermal nevus cells from congenital nevi cannot penetrate the dermis in skin reconstructs. *Pigment Cell Res* 15, 41-48.
- GOWN A. M., VOGEL A. M., HOAK D., GOUGH F., MCNUTT M. A. (1986): Monoclonal antibodies specific for melanocytic tumors distinguish subpopulations of melanocytes. *Am J Pathol* 123, 195-203.
- GROSS T. L., IHRKE P. J., WALDER E., AFFOLTER V. K. (2005): Skin Diseases Of The Dog And Cat. Second Edition. S. 814, 815, 815-816, 816, 817-818, 820-821, 822, 822-824, 825, 826-827, 827.
- HAUSCHILD A., GARBE C., BAUER J., HAMM H., KERL H., REUSCH M., ROMPEL R., SCHLAEGER M. (2006): Melanozytäre Nävi. *Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft* 4(8), 686-697.
- HEARING V. J. (1999): Biochemical control of melanogenesis and melanosomal organization. *JID Symposium Proceedings* 4(1), 24-28.
- HEARING V. J. (2005): Biogenesis of pigment granules: a sensitive way to regulate melanocyte function. *Journal of Dermatological Science* 37, 3-14.
- VAN HECKE D. (2002): Routine immunohistochemical staining today: choices to make, challenges to take. *The J Histotechnol* 25(1), 45-54.

- HENION P. D., WESTON J. A. (1997): Timing and pattern of cell fate restrictions in the neural crest lineage. *Development* 124, 4351-4359.
- HENRIQUE R., AZEVEDO R., BENTO M. J., DOMINGUES J. C., SILVA C., JERONIMO C. (2000): Prognostic value of Ki-67 expression in localized cutaneous malignant melanoma. *J Am Acad Dermatol* 43, 991-1000.
- HOASHI T., WATABE H., MULLER J., YAMAGUCHI Y., VIEIRA W. D., HEARING V. J. (2005): MART-1 is required for the function of the melanosomal matrix protein PMEL17/GP100 and the maturation of melanosomes. *The Journal of Biological Chemistry* 280(14),14006-14016.
- HOFBAUER G. F. L., KAMARASHEV J., GEERTSEN R., BÖNI R., DUMMER R. (1998): Tyrosinase immunoreactivity in formalin-fixed, paraffin-embedded primary and metastatic melanoma: frequency and distribution. *J Cutan Pathol* 25, 204-209.
- HÖINGHAUS R., MISCHKE R., HEWICKER-TRAUTWEIN M. (2002): Use of immunocytochemical techniques in canine melanoma. *J Vet Med* 49, 198-202.
- HOYT R. F., WITHROW S. J. (1984): Oral malignancy in the dog. *J Am Anim Hosp Assoc* 20, 83-92.

- HUI P., PERKINS A. S., GLUSAC E. J. (2001): Assessment of clonality in melanocytic nevi. *J Cutan Pathol* 28(3), 140-144.
- HUSSEIN M. R. (2008): Extracutaneous malignant melanomas. *Cancer Investigation* 26, 516-534.
- HUTCHINSON J. (1886): Melanosis often not black: melanotic whitlow. *Br Med J* 1, 491-492.
- HUVOS A. G., SHAH J. P., GOLDSMITH H. S. (1972): A clinicopathologic study of amelanotic melanoma. *Surg Gynecol Obstet* 135, 917-920.
- ITO S. (2003): A Chemist's View of Melanogenesis. *Pigment Cell Res* 16, 230-236.
- ITO S. (2009): Melanins seem to be everywhere in the body, but for what? *Pigment Cell Melanoma Res* 22, 12-13.
- JUNGBLUTH A. A., BUSAM K. J., GERALD W. L., STOCKERT E. D., COPLAN K. A., IVERSEN K. B. S., MACGREGOR D. P., OLD L. J., CHEN Y.-T. (1998): A103: An anti-Melan-A monoclonal antibody for the detection of malignant melanoma in paraffin-embedded tissues. *The American Journal of Surgical Pathology* 22(5), 595-602.
- JUNGBLUTH A. A., IVERSEN K., COPLAN K., KOLB D., STOCKERT E., CHEN Y. T., OLD L. J., BUSAM K. (2000): T311 – an anti-tyrosinase monoclonal antibody for the detection of melanocytic lesions in paraffin embedded tissues. *Pathol Res Pract* 196(4), 235-242.

JUNGI T. W. (2000): Antikörper. In: Klinische Veterinärimmunologie. S.25

KAWAKAMI Y., ELIYAHU S., DELGADO C. H., ROBBINS P. F., RIVOLTINI L., TOPALIAN S. L., MIKI T., ROSENBERG S. A. (1994): Cloning of the gene coding for a shared human melanoma antigen recognized by autologous T cells infiltrating into tumor. *Proc Natl Acad* 91, 3515-3519.

KELLY J. W., YEATMAN J. M., REGALIA C., MASON G., HENHAM A. P. (1997): A high incidence of melanoma found in patients with multiple dysplastic naevi by photographic surveillance. *Med J Aust* 167(4),191-194.

KIM D. Y., MAULDIN G. E., HOSGOOD G., CHO D.-Y. (2005): Perianal malignant melanoma in a dog. *J Vet Intern Med* 19(4), 610-612.

KOBAYASHI N., NAKAGAWA A., MURAMATSU T., YAMASHINA Y., SHIRAI T., HASHIMOTO M. W., ISHIGAKI Y., OHNISHI T., MORI T. (1998): Supra nuclear caps reduce ultraviolet induced DNA photoproducts in human epidermis. *Journal of Investigative Dermatology* 110, 806-810.

KOENIG A., WOHCIESZYN J., WEEKS B. R., MODIANO J. F. (2001): Expression of S100a, Vimentin, NSE, and Melan A/MART-1 in seven canine melanoma cell lines and twenty-nine retrospective cases of canine melanoma. *Vet Pathol* 38, 427-435.

- KÖHLER G., MILSTEIN C. (1976): Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. *Eur J Immunol* 6, 511-519.
- LEVER W. F., SCHAUMBURG-LEVER G. (1990): Histopathology of the skin. 7<sup>th</sup> Edition. S. 756, 757, 757-758, 758-759, 759-763, 762.
- LIN J. Y., FISHER D. E. (2007): Melanocyte biology and skin pigmentation. *Nature* 445, 843-850.
- LUTHER H., ALTMAYER P., GARBE C., ELLWANGER U., JAHN S., HOFFMANN K., SEGERLING M. (1996): Increase of melanocytic nevus counts in children during 5 years of follow-up and analysis of associated factors. *Arch Dermatol* 132, 1473-1478.
- MACKIE R. M., CAMPBELL I., TURBITT M L. (1984): Use of NKI C3 monoclonal antibody in the assessment of benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol* 37, 367-372.
- MAGANA-GARCIA M., ACKERMANN A. B. (1990): What are nevus cells? *The American Journal of Dermatopathology* 12(1), 93-102.
- MARENHOLZ I., HEIZMANN C. W., FRITZ G. (2004): S100 proteins in mouse and man: from evolution to function and pathology (including an update of the nomenclature). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322, 1111-1122.



- MCNUTT N. S. (1998): The S100 family of mutlipurpose calcium-binding proteins. *J Cutan Pathol* 25, 521-529.
- MEUTEN J. C. (2002): Tumors in domestic animals. Fourth Edition. S. 427.
- MIETTINEN M., FERNANDEZ M., FRANSSILA K., GATALICA Z., LASOTA J., SARLOMO-RIKALA M. (2001): Microphthalmia transcription factor in the immunohistochemical diagnosis of metastatic melanoma: comparison with four other melanoma markers. *Am J Surg Pathol* 25(2), 205-211.
- MIGHELL A. J., HUME W. J., ROBINSON P. A. (1998): An overview of the complexities and subtleties of immunohistochemistry. *Oral Diseases* 4, 217-223.
- MOOI W. J., KRAUSZ T. (2007): Pathology of melanocytic disorders. 2<sup>nd</sup> Edition, S. 1, 6-8, 7, 9, 10, 55-57, 62, 62-70, 71-74, 97-99, 136, 137, 168, 270, 287.
- MORETTI S., SPALLANZANI A., CHIARUGI A., FABIANI M., PINZI C. (2001): Correlation of Ki-67 expression in cutaneous primary melanoma with prognosis in a prospective study: different correlation according to thickness. *J Am Acad Dermatol* 44(2), 188-192.
- MOREY A. L., MURALI R., MCCARTHY S. W., MANN G. J., SCOLYER R. A. (2009): Diagnosis of cutaneous melanocytic tumours by four-colour fluorescence in situ hybridisation. *Pathology* 41(4), 383-387.

- MORSE D. E., COVA J. L. (1984): Pigmented cells in the leptomeninges of the cat. *Anat Rec* 210(1), 125-132.
- NISHIMURA E. K., JORDAN S. A., OSHIMA H., YOSHIDA H., OSAWA M., MORIYAMA M., JACKSON I. J., BARRANDON Y., MIYACHI Y., MISHIKAWA S (2002): Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination. *Nature* 416, 854-860.
- NISHIMURA E. K. (2011): Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* 24, 401-410.
- NOWAK M. A., FATTEH S. M., CAMPBELL T. E. (1998): Glycogen-rich malignant melanomas and glycogen-rich balloon cell malignant melanomas: frequency and pattern of PAS positivity in primary and metastatic melanomas. *Arch Pathol Lab Med* 122, 353-360.
- OHSIE S. J., SARANTOPOULOS G. P., COCHRAN A. J., BINDER S. W. (2008): Immunohistochemical characteristics of melanoma. *J Cutan Pathol* 35(5), 433-444.
- OKAZAKI K., UZUKA M., MORIKAWA F., TODA K., SEIJI M. (1976): Transfer mechanism of melanosomes in epidermal cell culture. *J Invest Dermatol* 67, 541-547.
- OLIVER III J. L., WOLFE L. G. (1992): Antigen expression in canine tissues, recognized by a monoclonal antibody generated against canine melanoma cells. *Am J Vet Res* 53(1), 123-128.

- ORCHARD G. E., WILSON JONES E. (1994): Immunocytochemistry in the diagnosis of malignant melanoma. *Br J Biomed Sci* 51, 44-56.
- ORCHARD G. E. (2000): Comparison of immunohistochemical labelling of melanocyte differentiation antibodies Melan-A, tyrosinase and HMB 45 with NKIC3 and S100 protein in the evaluation of benign naevi and malignant melanoma. *The Histochemical Journal* 32, 475-481.
- ORFANOS C., RUSKA H. (1968): Die Feinstruktur des menschlichen Haares III. Das Haarpigment. *Archiv für klinische und experimentelle Dermatologie* 231, 279-292.
- ORLOW S. J. (1995): Melanosomes are specialized members of the lysosomal lineage of organelles. *J Invest Dermatol* 105, 3-7.
- OYAMADA T., TANAKA H., PARK C.-H., UEKI H., KOMIYA T., ARAI S. (2007): Pathology of Canine Oral Malignant Melanoma with Cartilage and/or Osteoid Formation. *J Vet Med Sci* 69(11),1155-1161.
- LE PAPE E., WAKAMATSU K., ITO S., WOLBER R., HEARING V. J. (2008): Regulation of eumelanin/pheomelanin synthesis and visible pigmentation in melanocytes by ligands of the melanocortin 1 receptor. *Pigment Cell Melanoma Res* 21, 477-486.
- PLONKA P. M., PASSERON T., TOBIN D. J., SHIBAHARA S., THOMAS A., SLOMINSKI A., KADEKARO A. L., HERSHKOVITZ D., PETERS E., NORDLUND J. J., ABDEL-MALEK Z., TAKEDA K., PAUS R., ORTONNE J. P., HEARING V. J., SCHALLREUTER K. U. (2009): What are melanocytes really doing all day long...? *Experimental Dermatology* 18, 799-819.

- LE POOLE I.C., MUTIS T., VAN DEN WIJNGAARD R. M., WESTERHOF W., OTTENHOFF T., DE VRIES R. R. (1993): A novel, antigen-presenting funktion of melanocytes and its possible relationship to hypopigmentary disorders. *The Journal of Immunology* 151(12), 7284-7292.
- PORRAS B. H., COCKEREII C. J. (1997): Cutaneous malignant melanoma: classification and clinical diagnosis. *Seminars in Cutaneous medicine and Surgery* 16(2), 88-96.
- PUKEL C. S., LLOYD K. O., TRAVASSOS L. R., DIPPOLD W. G., OETTGEN H. F., OLD L. J. (1982): G<sub>D3</sub>, a prominent ganglioside of human melanoma. *J Exp Med* 155, 1133-1147.
- RALFKIAER E., HOU-JENSEN K., GATTER K.C., DRZEWIECKI K. T., MASON D.Y. (1987): Immunohistological analysis of the lymphoid infiltrate in cutaneous malignant melanomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 410, 355-361.
- RAMOS-VARA J. A., BEISSENHERZ M. E., MILLER M. A., JOHNSON G. C., PACE L. W., FARD A., KOTTLER S. J. (2000): Retrospective study of 338 canine oral melanoma with clinical, histologic, and immunohistochemical revies of 129 cases. *Vet Pathol* 37, 597-608.
- RAMOS-VARA J. A., BEISSENHERZ M. E. (2000a): Optimization of immunohistochemical methods using two different antigen retrieval methods on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: experience with 63 markers. *J Vet Diagn Invest* 12, 307-311.

- RAMOS-VARA J. A. (2005): Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol* 42, 405-426.
- RAMOS-VARA J. A., MILLER M. A. (2011): Immunohistochemical identification of canine melanocytic neoplasms with antibodies to melanocytic antigen PNL2 and tyrosinase: comparison with Melan A. *Vet Pathol* 48(2), 443-450.
- RANDHAWA M., HUFF T., VALENCIA J.C., YOUNOSSI Z., CHANDHOKE V., HEARING V.J., BARANOVA A. (2009): Evidence for the ectopic synthesis of Melanin in adipose tissue. *The FASEB Journal* 23(3), 835-843.
- RAPOSO G., TENZY D., MURPHY D. M., BERSON J. F., MARKS M. S. (2001): Distinct protein sorting and localization to premelanosomes, melanosomes, and lysosomes in pigmented melanocytic cells. *The Journal of Cell Biology* 152(4), 809-823.
- RAPOSO G., MARKS M. S. (2007): Melanosomes – dark organelles enlighten endosomal membrane transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(10), 786-797.
- RIEGER E., HOFFMAN-WELLENHOF R., SOYER H. P., KOFLER R., CERRONI L., SMOLLE J., KERL H. (1993): Comparison of proliferative activity as assessed by proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 monoclonal antibodies in melanocytic skin lesions. A quantitative immunohistochemical study. *J Cutan Pathol* 20(3), 229-236.

- ROCHAIX P., LACROIX-TRIKI M., LAMANT L., PICHEREAUX C., VALMARY S., PUENTE E., AL SAATI T., MONSARRAT B., SUSINI C., BUSCAIL L., DELSOL G., VOIGT J.-J. (2003): PNL2, a New Monoclonal Antibody Directed against a Fixative-Resistant Melanocyte Antigen. *Mod Pathol* 16(5), 481-490.
- ROZANOWSKA M., SARNA T., LAND E. J., TRUSCOTT T. G. (1999): Free radical scavenging properties of melanin interaction of eu- and pheo-melanin models with reducing and oxidising radicals. *Free Radical Biology & Medicine* 26, 518-525.
- RUIZ F. S., ALESSI A. C., CHAGAS C. A., PINTO G. A. VASSALLO J. (2005): Immunohistochemistry in diagnostic veterinary pathology: a critical review. *J Bras Patol Med Lab* 41(4), 263-270.
- RUSTOM A., SAFFRICH R., MARKOVIC I., WALTHER P., GERDES H. H. (2004): Nanotubular highways for intercellular organelle transport. *Science* 303, 1007-1010.
- SALAMA I., MALONE P. A., MIHAIMEED F., JONES J. L. (2008): A review of the S100 proteins in cancer. *EJSO* 34, 357-364.
- SANDUSKY G. E., CARLTON W. W., WIGHTMAN K. A. (1985): Immunohistochemical staining for S100 protein in the diagnosis of canine amelanotic melanoma. *Vet Pathol* 22, 577-581.
- SANDUSKY G. E., CARLTON W. W., WIGHTMAN K. A. (1987): Diagnostic immunohistochemistry of canine round cell tumors. *Vet Pathol* 24, 495-499.

- SCHAUMBURG-LEVER G., METZLER G., KAISERLING E. (1991): Ultrastructural localization of HMB-45 binding sites. *J Cutan Pathol* 18, 432-435.
- SCHILLING T. F., KIMMEL C. B. (1994): Segment and cell type lineage restrictions during pharyngeal arch development in the zebrafish embryo. *Development* 120, 483-494.
- SCHMITT F. C., BACCHI C. E. (1989): S-100 protein: is it useful as a tumour marker in diagnostic immunocytochemistry? *Histopathology* 15, 281-288.
- SCHULTHEISS P. C. (2006): Histologic features and clinical outcomes of melanomas of lip, haired skin, and nail bed locations of dogs. *J Vet Diagn Invest* 18, 422-425.
- SCOTT G., ZHAO Q. (2001): Rab3a and SNARE proteins: potential regulators of melanosome movement. *J Invest Dermatol* 116(2), 293-304.
- SCOTT G., LEOPARDI S., PRINTUP S., NADDEN B. C. (2002): Filopodia are conduits for melanosome transfer to keratinocytes. *J Cell Sci* 115, 1441-1451.
- SEIJI M., FITZPATRICK T. B., BIRBECK M. S. C. (1961): The melanosome: a distinctive subcellular particle of mammalian melanocytes and the site of melanogenesis. *J Invest Dermatol* 36, 243-252.

- SINGH S. K., NIZARD C., KURFURST R., BONTE F., SCHNEBERT S., TOBIN D. J. (2008): The silber locus product (Silv/gp100/Pmel17) as a new tool for the analysis of melanosome transfer in human melanocyte-keratinocyte co-culture. *Experimental Dermatology* 17, 418-426.
- SLOMINSKI A., TOBIN D. J., SHIBAHARA S., WORTSMAN J. (2004): Melanin pigmentation in mammalian skin and its hormonal regulation. *Physiol Rev* 84, 1155-1228.
- SMEDLEY R. C., LAMOUREUX J., SLEDGE D. G., KIUPEL M. (2011): Immunistochemical diagnosis of canine oral amelanotic melanocytic neoplasms. *Vet Pathol* 48(1), 32-40.
- SMITH S. H., GOLDSCHMIDT M. H., MCMANUS P. M. (2002): A comparative review of melanocytic neoplasms. *Pathol* 39, 651-678.
- SOLOMON E. I., SUNDARAM U. M., MACHONKIN T. E. (1996): Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem Rev* 96(7), 2563-2606.
- SONNINO S., MAURI L., CHIGORNO V., PRINETTI A. (2006): Gangliosides as components of lipid membrane domains. *Glycobiology* 17(1), 1R-13R.
- SPANGLER W. L., KASS P. H. (2006): The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. *Vet Pathol* 43, 136-149.
- SPITZ S. (1948): Melanomas of childhood. *Am J Pathol* 24, 591-609.



- STARICCO R. J., PINKUS H. (1957): Quantitative and qualitative data on the pigment cells of adult human epidermis. *J Invest Dermatol* 28(1), 33-45.
- STRUNGS I. (2004): Common and uncommon variants of melanocytic naevi. *Pathology* 36(5), 396-403.
- SULAIMON S. S., KITCHELL B. E., EHRHART E. J. (2002): Immunohistochemical detection of melanoma-specific antigens in spontaneous canine melanoma. *J Comp Pathol* 127, 162-168.
- SULAIMON S. S., KITCHELL B. E. (2003): Review article. The biology of melanocytes. *Veterinary Dermatology* 14, 57-65.
- SWIFT J. A. (1964): Transfer of melanin granules from melanocytes to the corical cells of human hair. *Nature* 203, 976-977.
- TACHIBANA M. (1999): Sound needs sound melanocytes to be heard. *Pigment Cell Res* 12, 344-354.
- TAIXEIRA T. F., DA SILVA T. C., COGLIATI B., NAGAMINE M. K., DAGLI M. L. Z. (2010): Retrospective study of melanocytic neoplasms in dogs and cats. *Braz J Vet Pathol* 3(2), 100-104.
- TAKEDA K., TAKAHASHI N.-H., SHIBAHARA S. (2007): Neuroendocrine functions of melanocytes: beyond the skin-deep melanin maker. *Tohoku J Exp Med* 211, 201-221.

- TALVE L. A., COLLAN Y. U., EKFORS T. O. (1996): Nuclear morphometry, immunohistochemical staining with Ki-67 antibody and mitotic index in the assessment of proliferative activity and prognosis of primary malignant melanomas of the skin. *J Cutan Pathol* 23, 335-343.
- THEOS A. C., TRUSCHEL S. T., RAPOSO G., MARKS M. S. (2005): The Silver locus product Pmel17/gp100/Silv/ME20: controversial in name and in function. *Pigment Cell Res* 18, 322-336.
- THOMAS A. J., ERICKSON C. A. (2008): The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest. *Pigment Cell Melanoma Res* 21, 598-610.
- THORNE E. G., MOTTAZ J. H., ZELICKSON A. S. (1971): Tyrosinase activity in dermal nevus cells. *Arch Dermatol* 104, 619-624.
- TOBIN D. J., SLOMINSKI A., BOTCHKAREV V., PAUS R. (1999): The fate of hair follicle melanocytes during the hair growth cycle. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings* 4, 323-332.
- TODOROFF R. J., BRODEY R. S. (1979): Oral and pharyngeal neoplasia in the dog: a retrospective survey of 361 cases. *Journal of the American Veterinary medical association* 175, 567-571.

- TOLLESON H.W. (2005): Human melanocyte biology, toxicology, and pathology. *Journal of Environment Science and Health, Part C* 23(2), 105-161.
- TSATMALI M., ANCANS J., THODY A. (2002): Melanocyte funktion and its control by melanocortin peptides. *The Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50(2), 125-133.
- TUCKER M. A., GOLSTEIN S. M. (2003): Melanoma etiology: where are we? *Oncogene* 22, 3042-3052.
- UNNA P. G. (1893): Naevi und Naevocarcinoma. *Berliner Klinische Wochenschrift* 30, 14-16.
- VENNEGOOR C., CALAFAT J., HAGEMAN P., VAN BUITENEN F., JANSEN H., KOLK A. (1985): Biochemical characterization and cellular localization of a formalin-resistant melanoma-associated antigen reacting with monoclonal antibody NKI/C3. *Int J Cancer* 35, 287-295.
- WANGENMANN P., LIU J., MARCUS D. C. (1995): Ion transport mechanisms responsible for K<sup>+</sup> secretion and the transepithelial voltage across marginal cells of stria vascularis in vitro. *Hear Res* 84, 19-29.
- WASMEIER C., HUME A. N., BOLASCO G., SEABRA M. C. (2008): Melanosomes at a glance. *Journal of Cell Science* 121, 3995-2999.

WAYTE D. M., HELWIG E. B. (1968): Halo nevi. *Cancer* 22, 69-90.

WICK M. R., SWANSON P. E., ROCAMORA A. (1988): Recognition of malignant melanoma by monoclonal antibody HMB-45. An immunohistochemical study of 200 paraffin-embedded cutaneous tumors. *J Cutan Pathol* 15, 201-207.

WICK M. R., PATTERSON J. W. (2003): Immunohistology, and electron microscopy. *The Journal of Histotechnology* 26(4), 253-258.

WIECKER T.S., LUTHER H., BUETTNER P., BAUER J., GARBE C. (2003): Moderate sun exposure and nevus counts in parents are associated with development of melanocytic nevi in childhood. *Cancer* 97, 628-638.

WILKERSON M. J., DOLCE K., DEBEY B. M., HEEB H., DAVIDSON H. (2003): Metastatic balloon cell melanoma in a dog. *Veterinary Clinical Pathology* 32(1), 31-36.

DE WIT P. E. J., VAN'T HOF-GROOTENBOER B., RUITER D. J. et al. (1993): Validity of the histopathological criteria used for diagnosing dysplastic naevi: an interobserver study by the pathology subgroup of the EORTC malignant melanoma cooperative group. *Arch Dermatol* 133, 953-958.

DE WIT N. J. W., VAN MUIJEN G. N. P., RUITER D. J. (2004): Immunohistochemistry in melanocytic proliferative lesions. *Histopathology* 44, 517-541.

- WU X., BOWERS B., RAO K., WEI Q., HAMMER J. A. (1998): Visualization of melanosome dynamics within wild-type and dilute melanocytes suggests a paradigm for myosin V function in vitro. *The Journal of Cell Biology* 143(7), 1899-1918.
- WU X., HAMMER J. A. (2000): Making sense of melanosome dynamics in mouse melanocytes. *Pigment Cell Res* 13, 241-247.
- YAJIMA I., LARUE L. (2008): The location of heart melanocytes is specified and the level of pigmentation in the heart may correlate with coat color. *Pigment Cell and Melanoma Research* 21(4), 471-476.
- YAMAMOTO O., BHAWAN J. (1994): Three models of melanosome transfers in Caucasian facial skin: hypothesis based on an ultrastructural study. *Pigment Cell Res* 7, 158-169.
- YASUMOTO K., WATABE H., VALENCIA J. C., KUSHIMOTO T., KOBAYASHI T., APPELLA E., HEARING V. J. (2004): Epitope mapping of the melanosomal matrix protein gp100 (PMEL17). *The Journal of Biological Chemistry* 279(27), 28330-28338.
- YAZIJI H., GOWN A. M. (2003): Immunohistochemical markers of melanocytic tumors. *Int J Surg Pathol* 11(1), 11-15.
- YU L. L., FLOTTE T. J., TANABE K. K., GADD M. A., COSIMI A. B., SOBER A. J., MIHM M. C. JR., DUNCAN L. M. (1999): Detection of microscopic melanoma metastases in sentinel lymph nodes. *Cancer* 86(4), 617-627.

ZECCA L., STROPPOLO A., GATTI A., TAMPELLINI D., TOSCANI M., GALLORINI M., GIAVERI G., AROSIO P., SANTAMBROGIO P., FARIELLO R. G., KARATEKIN E., KLEINMAN M. H., TURRO N., HORNYKIEWICZ O., ZUCCA F. (2004): The role of iron and copper molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging. *PNAS* 101, 9843-9848.

ZECCA L., BELLEI C., COSTI P., ALBERTINI A., MONZANI E., CASELLA L., GALLORINI M., BERGAMASCHI L., MOSCATOLI A., TURRO N.J., EISNER M., CRIPPA P.R., ITO S., WAKAMATSU K., BUSH W.D., WARD W.C., SIMON J.D., ZUCCA F.A. (2008): New melanic pigments in the human brain that accumulate in aging and block environmental toxic metals. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(45), 17567-17572.

ZHANG S., CORDON-CARDO C., ZHANG H. S., REUTER V. E., ADLURI S., HAMILTON W. B., LLOYD K. O., LIVINGSTON P. O. (1997): Selection of tumor antigens as targets for immune attack using immunohistochemistry: 1. Focus On Gangliosides. *Int J Cancer* 73, 42-49.

ZIMMER D. B., SADOSKY P. W., WEBER D. J. (2003): Molecular mechanisms of S100-target protein interactions. *Microscopy Research and Technique* 60, 552-559.

ZUBOVITS J., BUZNEY E., YU L., DUNCAN L. M. (2004): HMB-45, S-100, NKI/C3, and MART-1 in metastatic melanoma. *Hum Pathol* 35(2), 217-223.

## 9. HERSTELLERVERZEICHNIS

### 9.1 Chemikalien und sonstige Materialien

*Agar scientific Ltd*

Uranylacetat (R126A)

*AppliChem, Darmstadt*

Aceton (A1582), Essigsäure 100% (A0820), Wasserstoffperoxid 30% (...)

*Brand*

Pipettenspitzen, Pipetten

*Bundesmonopolverwaltung für Branntwein, Offenbach am Main*

Ethanol vergällt

*ChemPur*

Osmiumtetroxid-Lösung (006051)

*CLN*

Xylol

*DAKO Diagnostica GmbH, Hamburg*

Primärantikörper: monoklonaler Maus anti-human Melanosom Antikörper, Klon HMB45 (M0634), monoklonaler Maus anti-human MelanA Antikörper, Klon A103 (M7196), polyklonaler Kaninchen anti-S100 Antikörper (Z0311), polyklonaler Kaninchen anti-human CD3 Antikörper (A045201), polyklonaler Kaninchen anti-human CD117 Antikörper (A450229), monoklonaler Maus anti-human CD20 Antikörper (M75501), monoklonaler Maus anti-human Zytokeratin Antikörper (M351501). Sekundärantikörper: polyklonaler, Peroxidase konjugierter Kaninchen anti-Maus Immunglobulin Antikörper (PO161), polyklonaler, biotinylierter Ziege anti-Maus Immunglobulin Antikörper (E0433), Proteinase K (3020).

*engelbrecht medizin- und labortechnik GmbH, Edenmühle*

Deckgläser (k12440), Feather Microtome Blades „S35” Type (14705), Histokitt (1025/500), Paraffin (17932a), Star Frost adhesive Objektträger, Uni-Link Einbettkassetten mit angehängtem Deckel (17985)

*Kem-En-Tec Diagnostics A/S*

DAB-Tablette 10mg, 50pcs (Cat.-Nr. 4170)

*Linaris Biologische Produkte*

Histoprime®, HistoGreen (E109).

*neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH*

Dinatriumhydrogenphosphat (4820), Kaliumdihydrogenphosphat (2830), Methanol (1600), Natriumchlorid (1230), Natriumlauge (5630), 1 M Salzsäure (1040), Saccharose (5015), Salzsäure 25% (5030), Salzsäure 37% (5052), TRIS (5670), Zitronensäure-Monohydrat (84345).

*Maco Photoproducts*

Planfilme EM-Film (ES206)

*Merck, Darmstadt*

Aluminiumsulfat (1102), Bleinitrat 1 M (7398), Diäthylbarbitursäure-Natrium-salz (6318), Eosin G (15935), Giemsa Azur-Eosin-Metylenblaulösung (09204), Kaliumpermanganat (5082), Kernechtrot (59226), Mayers Hämaunlösung (09249), Natriumacetat-3-Hydrat (6267), Natriumcitrat (6448), NaOH Plätzchen (6498), Oxalsäure (495), 1 N Salzsäure (09060).

*SAV Liquid Production*

Formaldehyd max. 37,5% (EG-Nr. 200-001-08, N-30009)



*Serva*

p-Dimethyl-aminomethyl-phenol (3697501), Dodecenylnbernsteinsäureanhydrid (2075501), Glycidether 100 (2104502), Methylnadicanhydrid (2945201)

*Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen*

EDTA

*Stock Veco B.B., Niederlande*

Kupferringe

*Vector Laboratories*

Sekundärantikörper: biotinylierter Ziege anti-Kaninchen Immunglobulin Atnikörper (W2206). Nachweisreagenz: Vectastain® Elite ABC-Kit PK-6100.

## **9.2 Geräte**

*Bovimed*

Histomaster Modell 2050/Di, Einbettungsautomat

*Gesellschaft für Labortechnik*

Wasserbad 1052

*Heidolph GmbH*

Magnetrührer, digital 2002

*Kryptofix*

Kühlplatte

*Leica, Bensheim*

Mikroskop Ident.-Nr. 122293

*Medite Medizintechnik*

Ausgießstation, TBS 88 Paraffin Embedding

*Microm HM 315*

Rotationsmikrotom

*Piccolo plus*

HJ1295 amplified Electrode

*Reichert*

Ultratrim, Ultracut E

*Sartorius laboratory*

Analysewaage

*Scout*

Analysewaage, BJ 403984

*Wild Heerburg*

Mirkoskop

*Quelle privileg*

Wärmeschränk, Prod.-Nr. 652.315.3

*Zeiss*

EM 10

---

**10. ANHANG****DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. W. Hermanns danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die Unterstützung bei der Durchführung dieser Arbeit sowie für die Anfertigung des Bildmaterials und die zügige Durchsicht des Manuskripts.

Danken möchte ich auch Herrn Dr. W. Breuer für die engagierte Betreuung der Versuchsphase.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Prof. Dr. R. Hein für die Bereitstellung der humanen Positivkontrollen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Frau E. Kemper für die Einarbeitung in die Immunhistochemie, bei Frau A. Siebert für die Unterstützung im Bereich der Elektronenmikroskopie. Auch gilt mein Dank der an dieser Stelle nicht namentlich erwähnten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern am Institut für Tierpathologie für die Hilfsbereitschaft und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Dankbar bin ich auch meiner Tante, die mir beim Formatieren eine große Hilfe war.